

KETTELIN APARECIDA ARBOS

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE VEGETAIS DA FAMÍLIA CRUCIFERAE DE DIFERENTES CULTIVOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Almeriane M. Weffort Santos

Co-orientador:

Prof. Tit. Cid Aimbiré de M. Santos

CURITIBA

2004

TERMO DE APROVAÇÃO

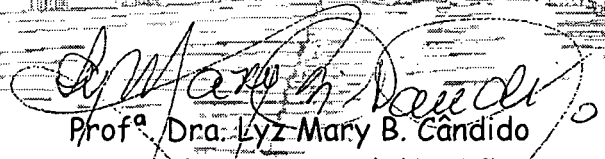
KETTELIN APARECIDA ARBOS

"ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE VEGETAIS DA
FAMÍLIA CRUCIFERAE DE DIFERENTES CULTIVOS"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de
grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte
Banca Examinadora:


Prof.^a Dra. Almeriane Maria Weffort Santos (orientadora)
Departamento de Patologia Médica
Universidade Federal do Paraná


Prof.^a Dra. Suzana Guimarães Leitão
Departamento de Produtos Naturais e Alimentos
Universidade Federal do Rio de Janeiro


Prof.^a Dra. Lyz Mary B. Cândido
Departamento de Nutrição
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de janeiro de 2004

Nota biográfica

A autora graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal do Paraná em 2001, tendo iniciado sua carreira como nutricionista da empresa GR, atuando como gerente de produção nos restaurantes da Renault e Kraft Foods. Em 2002, iniciou sua carreira como professora do Curso de Nutrição da UniAndrade, assumindo as disciplinas de Higiene de Alimentos e Supervisão de Estágio de Aprendizagem Capacitação Prática em Nutrição Clínica, pelas quais é responsável até o momento. No ano de 2002, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, onde desenvolveu uma pesquisa sobre a capacidade antioxidante de crucíferas de diferentes culturas, cujos resultados estão contidos nesta dissertação. Em fevereiro de 2004, a autora assumirá a coordenação do Curso de Nutrição da Faculdade de Pato Branco-PR.

Dedicatória

Ao meu amor, Sérgio.

Agradecimentos

A Deus, que conduz minha vida e me deu forças para vencer mais este desafio.

A UFPR, por toda minha formação profissional.

Aos meus orientadores, pelo constante apoio, incentivo e amizade, fundamentais em todos os momentos. Em especial a professora Almeriane, pelo seu surpreendente entusiasmo e dedicação e por ter acreditado e possibilitado a realização deste trabalho.

Aos professores Maria Suely Soares e José Domingos Fontana, pelo acesso aos equipamentos e reagentes, e ao professor Adilson dos Anjos, pelo apoio estatístico.

Ao Dr. Michael A. Cross e Dra. Ilária Bellantuono, pela doação da fenil-hidrazina e vitamina C.

Aos produtores que gentilmente cederam os vegetais para esta pesquisa científica.

Às funcionárias Irene, Clarí e Maria, pela contribuição na organização do laboratório e coleta de sangue.

Aos meus amigos Carla, Waldemar, LÍlian, Lucielly, Larissa, Vanessa, Carina, Mônica, Carolina e Fabiana e aos colegas da pós-graduação, pelas alegrias e tristezas compartilhadas durante o período do mestrado e que esta amizade perdure após a finalização desta etapa.

Aos meus pais Marcos e Sueli, que partilharam comigo conquistas e derrotas no percurso de minha vida.

As minhas queridas irmãs Kerlay e Kemyle, pelo constante carinho e por tornarem minha vida especial.

Ao Sérgio, a quem dedico este trabalho, por sempre acreditar no meu sucesso e por dar um significado especial à minha vida.

E a todos aqueles que, voluntariamente, doaram seu sangue em prol desta investigação científica.

Epígrafe

*"Enquanto estivermos tentando, estaremos felizes,
lutando pela definição do indefinido,
pela conquista do impossível,
pelo limite do ilimitado,
pela ilusão de viver.
Quando o impossível torna-se um desafio,
a satisfação estará no esforço
e não apenas na realização final."*

Gandhi

Sumário

NOTA BIOGRÁFICA	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	v
LISTA DE FIGURAS E ESQUEMA.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIações E SIGLAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO	1
1.1 Espécies Reativas de Oxigênio	2
1.2 Consequências do estresse oxidativo.....	4
1.3 Antioxidantes	5
1.4 Compostos naturais como fonte de antioxidantes.....	8
1.5 Vegetais como protetores e promotores da saúde.....	9
1.6 Diferentes tipos de cultivos vegetais.....	10
1.7 Agricultura orgânica: uma visão mundial e o mercado brasileiro....	12
1.8 Qualidade dos alimentos orgânicos.....	14
1.9 Composição química e valor nutricional de vegetais da família Cruciferae	14
1.10. Poder antioxidante de vegetais da família Cruciferae.....	16
1.11 O eritrócito humano e seu sistema antioxidante.....	16
1.12 O eritrócito humano e o estresse oxidativo.....	18
1.13 Eritrócitos sob ação de drogas oxidantes.....	22
1.14 Métodos experimentais de avaliação da atividade antioxidante.	22
OBJETIVOS.....	27
JUSTIFICATIVA.....	28
METODOLOGIA.....	29
2.1 Soluções.....	29

2.2 Material vegetal.....	30
2.3 Determinação do teor em umidade.....	31
2.4 Preparação dos extratos.....	31
2.5 Abordagem do potencial antioxidante dos extratos por cromatografia em camada delgada	33
2.6 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.....	33
2.7 Ensaio de redução do radical livre DPPH.....	33
2.8 Ensaio de inibição de formação de metahemoglobina induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina em eritrócitos humanos.....	34
2.9 Pesquisa de flavonóides.....	37
2.10 Análise estatística.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1 Teor de umidade.....	40
3.2 Avaliação da atividade antioxidante de crucíferas pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio.....	42
3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos de brócolis e couve-manteiga.....	44
3.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de brócolis e couve-manteiga pelo método da redução do DPPH.....	47
3.5 Doseamento de flavonóides.....	59
3.6 Ensaio de inibição da formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina em eritrócitos humanos.....	60
CONCLUSÃO.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	83

Lista de Figuras e Esquema

Figura 1. Espécies reativas de oxigênio comumente geradas durante processos metabólicos.....	2
Figura 2. Conversão do oxigênio em água em sistemas enzimáticos biológicos.....	6
Figura 3. Produção de vegetais pelo sistema hidropônico.....	11
Figura 4. Apresentação comercial de vegetais produzidos pelo sistema orgânico.....	13
Figura 5. Metabolismo anaeróbico do eritrócito humano e sua interrelação com o ciclo das pentoses.....	19
Figura 6. Formação de corpos de Heinz pela ação de espécies reativas de oxigênio.....	21
Figura 7. Colorações dos extratos após redução do complexo fosfomolibdênico.....	43
Figura 8. Comparação da atividade antioxidante de extratos vegetais da família Cruciferae obtidos de cultivo orgânico, hidropônico e convencional.....	45
Figura 9. Cromatografia em camada delgada dos extratos de couve-manteiga e brócolis, revelados com solução de DPPH	46
Figura 10. Atividade antioxidante de extrato de brócolis avaliada pelo método de redução do DPPH.....	48
Figura 11. Influência do tempo de reação na redução do radical DPPH*.....	49
Figura 12. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de brócolis avaliada pelo teste de redução do radical DPPH*.....	54

Figura 13. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de brócolis avaliada pelo teste de redução do radical DPPH*.....	56
Figura 14. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de crucíferas avaliados pelo teste de redução do radical DPPH*.....	58
Figura 15. Efeito da fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos.	62
Figura 16. Efeito do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo orgânico sobre a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos.....	63
Figura 17. Efeito do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo hidropônico sobre a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos.....	64
Figura 18. Efeito do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo convencional sobre a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos.....	66
Figura 19. Efeito do extrato de brócolis obtido de cultivo orgânico sobre a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos.....	67
Figura 20. Efeito do extrato de brócolis obtido de cultivo convencional sobre a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos.....	69
Esquema 1. Proposta de mecanismos de reação para substâncias fenólicas com DPPH.....	24

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de vegetais da família Cruciferae e sua denominação popular, comumente presentes na dieta humana.....	15
Tabela 2. Teor de umidade de vegetais frescos da família Cruciferae obtidos sob diferentes tipos de cultura.....	41
Tabela 3. Capacidade antioxidante dos extratos de couve-manteiga e brócolis (mg/ml), obtidos de diferentes cultivos, na presença ou não de clorofila e substâncias lipofílicas, avaliada pelo método do DPPH, usando-se a vitamina C como padrão de referência.....	53
Tabela 4. Doseamento de flavonóides totais em extrato de vegetais da família Cruciferae.....	59

Lista de Símbolos, Abreviações e Siglas

α	alfa
β	beta
δ	delta
μg	micrograma
$\mu\text{g/ml}$	microgramas por mililitro
μm	micrometro
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	molibdato de amônio hidratado
[]	concentração
~	aproximadamente
$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
Abs	absorvância
AcOEt	acetato de etila
ADP	adenosina-5'-difosfato
AlCl_3	cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARP	poder antioxidante ou antiradical
ATP	adenosina 5' trifosfato
BHA	butil-hidroxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
CCD	cromatografia em camada delgada
CO_2	dióxido de carbono
conv.	tipo de cultivo convencional
Cu	cobre
d	dia
dl	decilitro
DNA	ácido dexoxiribonucléico
DPPH [•]	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DP	desvio padrão
e^-	elétron
EC	concentração efetiva
EDTA- K_3	etilenodiaminotetracetato tripotássico
EPM	erro padrão da média
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fe	átomo de ferro
Fe^{+2}	ion ferroso
Fe^{+3}	ion férrico
Fh	cloridrato de fenil-hidrazina
g	aceleração da gravidade

Fe^{+3}	íon férrico
Fh	cloridrato de fenil-hidrazina
g	aceleração da gravidade
g	gramas
G6-PD	glucose 6-fosfato desidrogenase
GSH	glutathiona reduzida
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSSG	glutathiona oxidada
h	horas
H^+	íon hidrogênio
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	ácido sulfúrico
Hb	hemoglobina
HCl	ácido clorídrico
hidrop.	tipo de cultivo hidropônico
infloresc.	inflorescência
K_2HPO_4	fosfato de potássio dibásico
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	ferricianeto de potássio
KH_2PO_4	fosfato de potássio monobásico anidro
M/15	tampão fosfato 67 mM
M/60	tampão fosfato 16 mM
metaHb	metahemoglobina
mg	miligrama
mg/ml	miligrama por mililitro
min	minuto
ml	mililitros
mM	milimolar
Mo	molibdato
N	normal
Nº	número
Na_2HPO_4	fosfato dissódico
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NaCN	cianeto de sódio
NAD+	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	fosfato monossódico di-hidratado
NaOH	hidróxido de sódio
NaPO_4	fosfato de sódio
NH_4Cl	cloreto de amônio
nm	nanômetros
O_2	oxigênio
O_2^\bullet	radical superóxido

°C	graus Celsius
OH•	radical hidroxila
org.	tipo de cultivo orgânico
p/v	peso por volume
PBS	solução salina tamponada com fosfato
pH	potencial hidrogênioônico
RNA	ácido ribonucléico
SOD	enzima superóxido dismutase
TBH	<i>tert</i> -butil hidroperóxido
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	radiação ultravioleta
v/v	volume por volume
var.	variedade
Zn	zinco

Resumo

Radicais livres (RL) são formados durante o metabolismo celular regular e, por serem substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas, são capazes de causar oxidação e danos irreversíveis à célula, comprometendo sua função. Apesar da excessiva produção de RL, estes são inativados por antioxidantes. A família Cruciferae possui exemplares importantes na dieta do homem, contribuindo como fonte importante de vitaminas antioxidantes, minerais, fibras, flavonóides, carotenóides, dentre outros fitoquímicos. Desta maneira, destaca-se a importância de avaliar-se o seu potencial antioxidante, uma vez que seu consumo é regular na dieta do brasileiro. No presente trabalho, a capacidade antioxidante de extratos obtidos de repolho branco (*Brassica oleracea* var. *capita* L.), couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.), couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cauliflora*), brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa*), agrião (*Nasturtium officinalis* L.) e rabanete (*Raphanus sativus radicular*), obtidos de cultivo convencional, hidropônico e orgânico quando possível, foi avaliada *in vitro* pelos métodos químicos de redução do complexo fosfomolibdênio e do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Em paralelo, desenvolveu-se um ensaio biológico *in vitro* para avaliação da ação antioxidante dos extratos de couve-manteiga e brócolis utilizando eritrócitos humanos normais submetidos à sobrecarga oxidativa imposta pela fenil-hidrazina como modelo experimental, onde se mensurou a formação de metahemoglobina. Investigou-se, também, a influência da presença de clorofila e substâncias lipofílicas (C/SL) no potencial antioxidante desses vegetais. Os extratos das crucíferas avaliados demonstraram relevante capacidade antioxidante, porém com variação na intensidade do efeito dependendo da espécie estudada, da concentração do extrato, do tipo de cultivo, assim como do método analítico empregado. A retirada de C/SL parece aumentar a capacidade antioxidante dos extratos, independente do tipo de cultivo, mas de forma significativa apenas nos vegetais de cultivo convencional. Importante destacar que o ensaio biológico proposto por este trabalho, mostrou ser um método sensível, rápido, reprodutível e de custo praticável. Embora devam ser interpretados com cautela, pois inúmeros fatores interferem na qualidade dos vegetais, como a composição do solo, o clima e o tipo de cultivo, os resultados dos efeitos antioxidantes aqui apresentados e discutidos favorecerem os efeitos benéficos do consumo de crucíferas, com destaque àquelas de cultivo orgânico associados, possivelmente, ao fato de não apresentarem resíduos de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos e terem maior conteúdo em nutrientes.

Palavras-chave: Cruciferae, antioxidante, tipos de cultivo, clorofila, DPPH, metahemoglobina.

Abstract

Free radicals are formed throughout cellular metabolism. As fairly unstable and highly reactive substances, they are able to cause oxidation and sometimes-irreversible damage to the cells, compromising their function. Although produced at high levels, most of them can be inactivated by antioxidants. The Cruciferae family has many species that are important for the regular human diet, as they provide important antioxidant components such as vitamins, minerals, fibers, flavonoids, carotenoids amongst others phytochemicals. As such, it is important to evaluate their antioxidant potential as they are routinely present as part of the Brazilian folk meals. In the present work, the antioxidant capability of the extracts prepared from white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.), cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cauliflora*), broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa*), water-cress (*Nasturtium officinalis* L.) and radish (*Raphanus sativus* *radical* L.), obtained from conventional, hydroponics, and organic agricultural procedures whereas possible, was investigated in vitro by the chemical methods of phosphomolybdenum complex and DPPH. In parallel, we have developed an in vitro biological assay for investigating the antioxidant potential of the kale and broccoli extracts using normal human erythrocytes under oxidative stress imposed by phenylhydrazine as an experimental model, in which the methemoglobin levels were measured. The influence of chlorophyll and lipophilic components (C/LS) on the antioxidant properties of these extracts was also studied. Although the intensity of the effects varied according to the species and dose investigated, their way of growing, and the methodological approach used, all Cruciferae extracts included in this work have shown significant antioxidant capacity when compared to the controls. The absence of C/LS resulted in the enhancement of the extracts' antioxidant potential, independently of the type of culture, but it reached significant levels only for the extracts prepared from the conventional agriculture. Of particular interest were the results derived from the biological method proposed that have shown to be sensitive, fast, reproducible, and economically feasible. Although the antioxidant results herein presented and discussed must be interpreted with caution as a list of factors such as soil composition, climate or culture technology can influence the vegetables' quality, they favor the beneficial effects of consuming Cruciferae vegetables, particularly those obtained from organic culture, including their advantage of having less fertilizer and toxic residues associated with high levels of solid nutrients.

Key words: Cruciferae, antioxidant, agricultural type, chlorophyll, methemoglobin, DPPH.

Introdução

A transição de nosso planeta para uma biosfera com oxigênio (O_2) abundante permitiu a proliferação de organismos com vias metabólicas altamente energéticas, requisitando um fluxo contínuo e seguro de O_2 do ambiente para os tecidos (Anderson e Phillips, 1999). Do oxigênio total consumido pelos organismos aeróbios, apenas 10-15% é metabolizado via oxidases; o remanescente é principalmente utilizado na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. Neste processo, o oxigênio é reduzido à água sob a ação da citocromo oxidase, enquanto o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), cofator da reação, é oxidado a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), necessário à produção de adenosina-5'-trifosfato (ATP) (Alberts *et al.*, 1994).

Durante o metabolismo celular regular, várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas com moléculas biológicas são produzidas, as quais são genericamente denominadas radicais livres. Essas moléculas são capazes de causar oxidação e danos irreversíveis à célula, comprometendo sua função (Anderson, 1996; Benavente *et al.*, 2000; Oliveira, 2003).

A fonte desses radicais livres pode ser endógena, associada à reações metabólicas como, por exemplo, na reação de oxidação na mitocôndria com a interrupção do transporte de elétrons; na fagocitose excessiva durante o processo de inflamação; na ativação do metabolismo do ácido araquidônico, exógena devido, por exemplo, às radiações ultravioleta (UV) ou mesmo ambiental (pesticidas, poluição, fumaça de cigarro) (Jay e Berthon, 1998; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Sousselier e Berthon, 1998). No entanto, sob condições normais, sua principal fonte é o escape eletrônico das cadeias de transporte, particularmente nas mitocôndrias, local onde o O_2 é reduzido à água em etapas sequenciais (Yamamoto, 2001).

Para a redução completa de uma molécula de O_2 em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados no interior da membrana mitocondrial

interna. Entretanto, 1-2% desses elétrons são perdidos durante o transporte, levando à formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e, subseqüentemente, de outras numerosas espécies reativas de O_2 , como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH^{\bullet}) (Anderson, 1996; Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Wickens, 2001; Yamamoto, 2001). Essas espécies químicas estão habitualmente envolvidas com o estresse oxidativo, definido como uma ruptura do equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes em favor destes últimos, levando a danos celulares ou teciduais (Chow, 2002; Chu *et al.*, 2002).

1.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ERO), como as ilustradas na Figura 1, são caracterizadas pela sua alta reatividade e facilidade de oxidar outras moléculas, contudo com intensidade de ação distintas (Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Wickens, 2001).

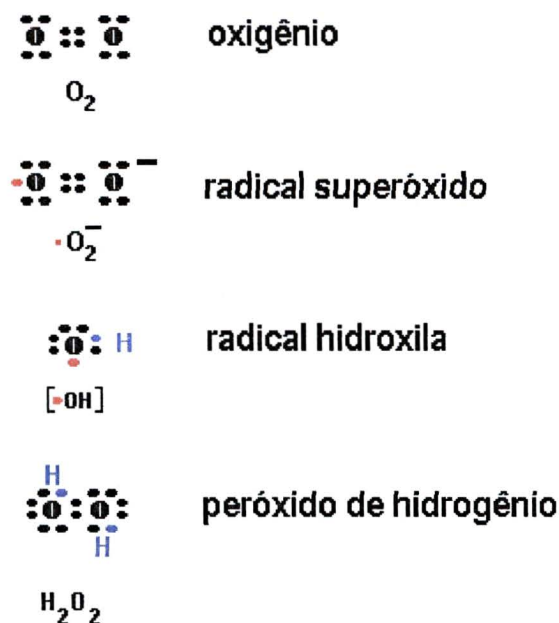


Figura 1. Espécies reativas de oxigênio comumente geradas durante processos metabólicos

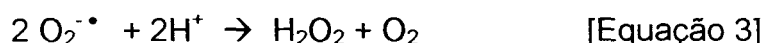
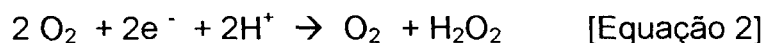
Adaptado de Biology, 2002

Nos organismos vivos, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é formado a partir da redução do O_2 pela transferência de um elétron (e^-) doado pela hemoglobina, citocromos, quinonas, tióis ou metais de transição (Equação 1).



O $O_2^{\bullet -}$ é fracamente reativo, mas pode converter-se em espécies mais reativas devido à possibilidade de dois radicais superóxido combinarem-se com H_2O_2 , gerando o radical OH^\bullet . Deve-se ressaltar que essa conversão é ferro-dependente e que muitos dos efeitos tóxicos atribuídos ao radical $O_2^{\bullet -}$ são devidos à sua conversão à OH^\bullet (Anderson e Phillips, 1999; Jay e Berthon, 1998).

Já o H_2O_2 pode ser formado pela redução bivalente do oxigênio (Equação 2) ou pela reação de duas moléculas, em uma reação chamada dismutação (Equação 3), ocorrendo espontaneamente ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Saltman, 1989).



O H_2O_2 é uma molécula estável, com capacidade de reagir com o Fe^{+2} dos sistemas biológicos, produzindo OH^\bullet , através da Reação de Fenton (Equação 4), (recentemente revisado por Filho, Silva et al. 1999). É decomposto em água espontaneamente ou por ação enzimática da catalase ou peroxidase. Este radical possui baixa reatividade e seus efeitos danosos não estão diretamente associados a um ataque a componentes celulares.



O OH^\bullet é altamente reativo e pode reagir com moléculas capazes de doar um elétron como enzimas, açúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos ou fosfolipídios de membranas. Este radical, no sistema biológico, possui potencial

destrutivo e mutagênico. Por exemplo, ao reagir com ácidos graxos da membrana (principalmente poliinsaturados), pode provocar alterações estruturais, ocasionando desorganização celular ou falha na transmissão das mensagens para dentro da célula. Ao reagir com proteínas, pode modificar sua estrutura; com o DNA, provoca a quebra da dupla fita, levando à mutações e morte celular (Jay e Berthon, 1998).

O radical OH^\bullet pode ser formado de três maneiras: (1) pela hidrólise da água devido à ação de radiação ionizante ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet$); (2) pela interação com metais, como o ferro e o cobre, através da Reação de Fenton ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$) ou (3) pela Reação de Haber–Weiss ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$) (Cotran *et al.*, 1994). A reação que produz o OH^\bullet requer um metal de transição, como o ferro, cobre ou cobalto, como agente catalisador. Essa produção é facilitada porque toda agressão a tecidos, traumática ou infecciosa, libera ferro. Esses eventos causam, ainda, a migração de neutrófilos, que também atuam como fontes geradoras de radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Além disso, os neutrófilos produzem oxigênio no estado singlete ($^1\text{O}_2$) capaz de atuar como radical livre, pois seus elétrons, mesmo emparelhados, situam-se em órbitas distantes do núcleo, tornando o átomo altamente reativo (Anderson, 1996; Anderson e Phillips, 1999; Fraga Filho, 2003).

1.2 Conseqüências do estresse oxidativo

O organismo está normalmente em equilíbrio entre produção e degradação de radicais livres. Quando existe um desequilíbrio entre as espécies reativas produzidas e a capacidade antioxidante, cria-se uma situação que se denomina estresse oxidativo (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Chow, 2002). As principais conseqüências do estresse oxidativo em sistemas biológicos são:

a) a peroxidação dos lipídios da membrana celular: inicia-se com a subtração de íons hidrogênio do grupo metileno dos fosfolipídios, com posterior produção de dienos conjugados, hidroperóxidos e formação de outras espécies reativas mais deletérias à célula, como os radicais alcóxil e peróxil. Com a lesão, altera-se a fluidez da membrana e, com isso, a sua permeabilidade; como conseqüência, ocorrem alteração das trocas iônicas, acarretando um influxo excessivo de cálcio,

o qual ativa enzimas autolíticas, causando proteólise e morte celular (Fraga Filho, 2003; Oliveira, 2003).

b) a oxidação de proteínas, resultante da ação dos radicais livres sobre os grupos tióis, causa agregação e fragmentação de aminoácidos. A reação pelos radicais livres do anel desoxirribose dos ácidos nucleicos promove mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) e no ácido ribonucleico (RNA) e inibição da síntese protéica (Oliveira, 2003), como já comentado.

1.3 Antioxidantes

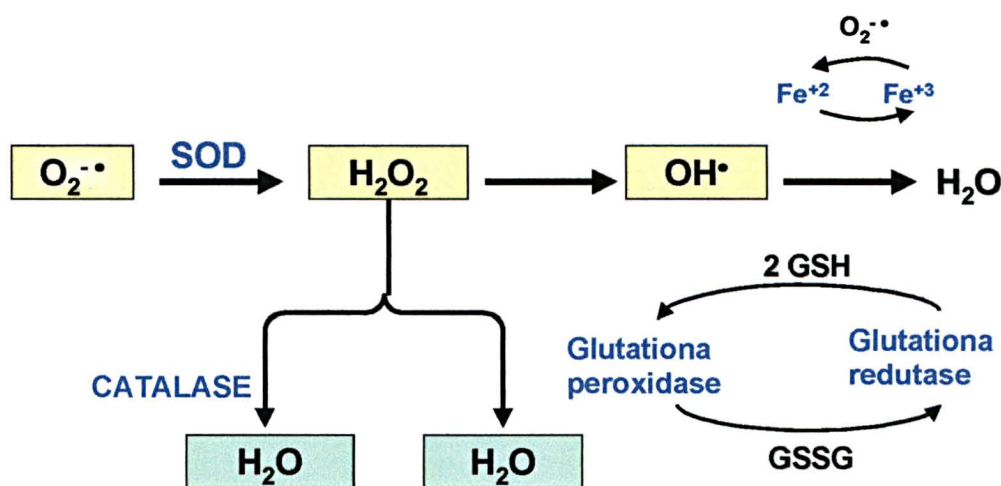
O dano oxidativo é a consequência da diminuição do potencial antioxidante e/ou aumento do estresse oxidativo. Apesar de existir normalmente excessiva produção de espécies reativas, estas são inativadas por substâncias denominadas antioxidantes (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Chow, 2002), que são substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de um substrato. Podem agir bloqueando a formação dos radicais livres ou interagindo com estes, inativando-os. Portanto, os antioxidantes são definidos como qualquer substância capaz de doar elétrons para um radical livre, inativando-o, tornando-o um composto eletricamente estável (Oliveira, 2003).

O perigo do estresse oxidativo no organismo é tão elevado que, além de uma defesa antioxidante enérgica, sistemas de reparo presentes nas células e fora delas estão envolvidos para a proteção contra sua destruição por radicais livres (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999). Além disso, a célula também é protegida por vários captadores não enzimáticos, incluindo carotenóides, a vitamina C (hidrossolúvel), a vitamina E (lipossolúvel), ubiquinol-10 (coenzima Q₁₀) e outras substâncias como cisteína, ácido úrico e glutatona. Utiliza-se, também, de substâncias quelantes de íons metálicos para prevenir a Reação de Fenton (Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Sousselier e Berthon, 1998; Wickens, 2001; Yamamoto, 2001).

a) Antioxidantes intracelulares

A evolução permitiu ao organismo desenvolver mecanismos de defesa para limitar a ação das ERO (Anderson e Phillips, 1999) e, neste contexto, as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), as catalases e a glutatona peroxidase

A maioria das enzimas antioxidantes são dependentes de co-fatores externos para que possam desempenhar suas atividades. A SOD, por exemplo, é uma enzima dependente de cobre e zinco, localizada no citosol, responsável pela dismutação de dois radicais superóxido em um peróxido de hidrogênio. Possui meia vida curta (menos de 10 min) e não penetra nas células (Halliwell, 1999; Renz, 2003; Telen e Kaufman, 1999).



O₂: oxigênio; O₂^{•-}: anion superóxido; SOD: superóxido dismutase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; GSH: glutatina reduzida; GSSG: glutatona oxidada, OH[•]: íon hidroxila.

A catalase é um tetrâmero com quatro grupamentos heme e, encontrando-se predominantemente nos peroxissomos, é responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999). O H_2O_2 pode ser eliminado pela ação da GSH-Px, localizada no citosol, na mitocôndria ou no meio extracelular. Sua ação é converter o H_2O_2 em H_2O e os hidroperóxidos lipídicos oriundos da membrana, em álcoois estáveis (Anderson e Phillips, 1999; Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Fraga Filho, 2003; Fridovich, 1998). A ação desta enzima é desempenhada através da utilização da glutathiona reduzida (GSH), em reação catalisada pela glutathiona peroxidase. Após a doação de elétrons, a GSH passa a sua forma oxidada (GSSG), mas poderá ser regenerada através da glutathiona redutase, com transferência do hidrogênio do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (Renz, 2003).

b) Antioxidantes Extracelulares

Os antioxidantes hidrofílicos encontrados no sangue circulante ou nos fluidos intersticiais agem neutralizando diretamente os radicais livres ou através da sua participação em sistemas enzimáticos. Os principais são a glutathiona, o ácido úrico, a albumina, a haptoglobina e a hemopexina (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999).

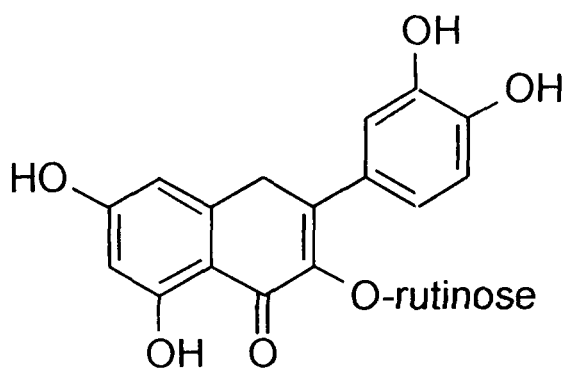
A vitamina C, ou ácido L-ascórbico, é uma substância hidrofílica, cuja função principal é proteger lipoproteínas da oxidação (May, 1998). Como antioxidante, seqüestra oxidantes neutrofílicos, OH^\bullet , H_2O_2 e ácido hipocloroso (Havsteen, 1983; Oliveira, 2003). Contudo, na presença de íons metálicos de transição, como o ferro e o cobre, o ascorbato pode tornar-se um agente pró-oxidante, causando intensa peroxidação lipídica (Carr e Frei, 1999).

A vitamina E encontra-se localizada tanto na membrana celular como nas lipoproteínas circulantes. Bloqueia a peroxidação lipídica por remover radicais peroxil, além de remover radicais O_2^\bullet , OH^\bullet e $^1\text{O}_2$ (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Havsteen, 1983; Oliveira, 2003). Os carotenóides, em geral, devido ao sistema de duplas conjugadas, protegem contra os efeitos deletérios de radicais livres (Cândido e Campos, 1995; Rao e Agarwal, 1999). O β -caroteno constitui a maior fonte de vitamina A e age como antioxidante por inibir a oxidação da fosfatidilcolina, impedindo a peroxidação lipídica (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Oliveira, 2003).

1.4 Compostos naturais como fonte de antioxidantes

Vários compostos isolados de plantas e vegetais, de natureza química diversificada promovem ação antioxidante reconhecida, em potencial aqueles que possuem, na sua estrutura, um grupamento fenólico, representados por taninos (Demirezer *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001), cumarinas (Fabre *et al.*, 2000; Kontogiorgis e Hadjipavlou-Litina, 2003), antraquinonas (Demirezer *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003), (como revisado por Spilkova e Dusek, 1996). Na última década, especial atenção tem sido dada ao potencial antioxidante dos flavonóides, em paralelo às suas propriedades antiinflamatórias (Hertog *et al.*, 1993), antivirais e antibacteriana (Hanasaki *et al.*, 1994), reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Burns *et al.*, 2000), câncer (Havsteen, 2002) e do envelhecimento precoce (Yamamoto, 2001).

O termo flavonóide engloba um grupo de compostos fenólicos com estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado, representado abaixo pela rutina (1) (Filho *et al.*, 1999), que, na natureza, possui distribuição ubíqua, sendo encontrado em praticamente todas as plantas, frutas e vegetais, estando presente abundantemente na dieta do homem (Bravo, 1998; van Acker *et al.*, 1998).



1

Estudos *in vitro* têm sugerido que o potencial antioxidante dos flavonóides possa estar associado às hidroxilas fenólicas presentes na sua estrutura, possibilitando a doação de elétrons dos grupos OH para os radicais livres (Chen, 1996; Heijnen *et al.*, 2001), estabilizando-os, além da quelação de íons metálicos, particularmente os divalentes, como o Cu^{+2} e o Zn^{+2} (Havsteen, 1983; Leake, 2001; Magnani *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1996). Neste contexto, é possível que a importante atividade antioxidante atribuída aos flavonóides seja a neutralização de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica (Anderson, 1996; Benavente *et al.*, 2000).

1.5 Vegetais como protetores e promotores da saúde

Dietas ricas em frutas e vegetais têm sido associadas à redução de doenças cardiovasculares (Rice-Evans *et al.*, 1996), certas formas de câncer (Bonnesen *et al.*, 2001) e outras doenças (Dashwood *et al.*, 1994; Sorensen *et al.*, 2001), mas pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dessas substâncias ou a sua relação com a quimioprevenção do câncer (Sorensen *et al.*, 2001). Neste contexto, estudos epidemiológicos em humanos e em animais demonstraram correlação entre o consumo de vegetais e a proteção contra cânceres de estômago, esôfago, pulmões, cavidade oral, faringe, endométrio, pâncreas e cólon (revisado por Steinmetz e Potter, 1996).

Os antioxidantes denominados nutricionais são aqueles comumente encontrados em frutas e vegetais, como o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno (vitamina A), os carotenóides e os compostos fenólicos, como os flavonóides (Oliveira, 2003), anteriormente apresentados.

Devido a sua diversificada composição, é provável que a ação antioxidante de extratos vegetais seja resultante da ação sinérgica dessas várias substâncias, pertencentes a diferentes grupos químicos, agindo simultaneamente no organismo (Sano *et al.*, 2003; Vang *et al.*, 2001). Entretanto, para se avaliar efetivamente a ação antioxidante dos vegetais, deve-se buscar, além do enfoque analítico de nutrientes, um enfoque sistêmico, pois inúmeros fatores interferem na qualidade dos vegetais, como a composição do solo, o clima ou o tipo de cultivo (Azevedo, 2003).

1.6 Diferentes tipos de cultivos vegetais

Atualmente, o principal sistema de produção de vegetais comestíveis é o denominado “**convencional**”, no qual esses alimentos são cultivados diretamente no solo, com o uso de fertilizantes químicos diversos e agrotóxicos, os quais são hormônios que atuam como inibidores da síntese de proteínas, enzimas e outras moléculas que impedem a proliferação dos agentes que parasitam essas plantas. São, também, chamados pesticidas, produtos fitosanitários ou defensivos agrícolas. Dentre os tipos de agrotóxicos mais usados e, ao mesmo tempo, os menos tóxicos, estão os herbicidas, enquanto os mais tóxicos são os inseticidas e os fungicidas. Dentre os maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, destacam-se o Japão, Estados Unidos, Itália, Reino Unido, Alemanha, Dinamarca e Brasil. Inúmeros casos de intoxicação, diagnosticados por sintomas como dor de cabeça, nervosismo, dificuldade para dormir e falta de apetite, têm sido relatados (Ferreira *et al.*, 2003). Além disso, uma série de problemas ambientais tem surgido, como problemas de erosão, baixa produtividade das terras e das culturas (Darolt, 2003). Por causa desta elevada toxicidade, a utilização dos agrotóxicos foi limitada através de leis federais que determinam a venda desses produtos somente com a apresentação de prescrição por profissional da área (Ferreira *et al.*, 2003).

Como uma alternativa ao sistema de produção convencional, surgiu o sistema de produção “**hidropônico**”, no qual os alimentos são cultivados sobre suportes artificiais, sem a presença do solo e sempre em ambiente protegido (estufas) (Figura 3) (Darolt, 2003). Entretanto, é preciso salientar que os alimentos produzidos em hidroponia também recebem soluções químicas para sua nutrição e para o tratamento de eventuais doenças pela água, embora a maioria dos consumidores desconheça esta informação.

Assim, torna-se importante destacar que os nitratos fornecidos aos vegetais através da água, utilizados para aumentar rapidamente a produtividade, quando ingeridos, passam à corrente sangüínea, podendo ser reduzidos a nitritos pela acidez do suco gástrico (Darolt, 2003). Esses, por sua vez, podem combinar-se com aminas, formando as nitrosaminas, substâncias com reconhecido potencial carcinogênico (Leitão, 2003; Rodet, 2003). De fato, dados recentes têm revelado que o teor em nitratos encontrado em vegetais hidropônicos tem sido relevantemente superior ao observado em vegetais de cultivo convencional ou

orgânico (Miyazawa *et al.*, 2001), reafirmando que o monitoramento destas substâncias é essencial para garantir a qualidade dos alimentos consumidos pela população.



Figura 3. Produção de vegetais pelo sistema hidropônico

1.7 Agricultura orgânica: uma visão mundial e o mercado brasileiro

Se a utilização de adubos químicos, por um lado, veio possibilitar maior rendimento das colheitas de modo a satisfazer quantitativamente as necessidades do homem, por outro lado, a qualidade nutricional desses alimentos tornou-se duvidosa. Hábitos alimentares mais saudáveis ligados à consciência sobre a questão ambiental são fatores que têm formado um novo tipo de consumidor e que aceleraram, na última década, a produção de alimentos cultivados pelo sistema “orgânico”. Este, segundo a Instrução Normativa Nº 007 em vigor no Brasil desde 1999, considera “*sistema orgânico de produção, todo aquele em que se adotam tecnologias que otimizem o uso de recursos naturais, tendo como objetivo a auto-sustentação, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de recursos não renováveis e a eliminação de agrotóxicos e outros insumos artificiais tóxicos*” (Brasil, 1999).

Os alimentos provenientes de sistema orgânico são identificados com um selo de qualidade presente nas embalagens (Figura 4), emitido por uma instituição certificadora, assegurando, desta maneira, que estes alimentos foram produzidos visando a preservação da saúde dos consumidores e do meio ambiente (Biodinâmico, 2003).

O desenvolvimento da agricultura orgânica mundial iniciou-se a partir dos trabalhos de adubação orgânica¹ realizados por Howard na Índia, no período de 1925-30 e, no Brasil, o movimento expandiu-se no final da década de 80, com a criação da Associação de Agricultura Orgânica (Ehlers, 1996). Nos últimos quatro anos, o mercado brasileiro de consumo de alimentos orgânicos foi um dos que mais cresceu no mundo, com taxas de 35% a 50% ao ano, contra 20% a 30% registrados nos EUA e em alguns países europeus (Penteado, 2000). O volume nacional de produção orgânica situa-se na faixa de US\$ 220-300 milhões, plantados em aproximadamente 100 mil hectares (Ormond *et al.*, 2002).

O Estado do Paraná vem se destacando, no cenário nacional, como grande produtor orgânico. Sua produção passou de 4.365 toneladas na safra 1996/97, para 35.539 toneladas na safra 2.000/01. Mais surpreendente ainda é que esse contingente produtivo é caracterizado pela exploração familiar, cuja área média por produtor é da ordem de 3,30 hectares (Emater, 2002).

¹ Uso de húmus de minhoca e adubos à base de resíduos animais e vegetais, como esterco, restos de folhas, minerais, vegetais e lixo orgânico.



Figura 4. Apresentação comercial de vegetais produzidos pelo sistema orgânico

1.8 Qualidade dos alimentos orgânicos

Até o momento, trabalhos que permitam uma comparação, considerando aspectos nutricionais e de saúde humana, entre alimentos produzidos por cultivo orgânico e pelo cultivo convencional, são escassos (Bourn e Prescott, 2002; Ren *et al.*, 2001; Williams, 2002) e estudos epidemiológicos em grandes populações submetidas a dietas com alimentos orgânicos comparadas à dietas com alimentos convencionais ainda não foram realizados (Darolt, 2003).

Em relação à qualidade nutricional, de forma geral, para a maioria dos nutrientes ainda não há um consenso em relação à superioridade dos orgânicos. Todavia, para alguns elementos, parece existir uma tendência mais clara, como por exemplo, um menor teor de nitratos (Azevedo, 2003; Bourn e Prescott, 2002), um teor superior de matéria seca (Bourn e Prescott, 2002; Williams, 2002) e um maior teor de vitamina C (Ren *et al.*, 2001; Smith, 1993; Williams, 2002) em produtos orgânicos, notadamente em legumes e folhosas. Em relação à presença de compostos fenólicos, a maioria dos estudos mostra um teor mais elevado em produtos provenientes da agricultura orgânica (Azevedo, 2003; Ren *et al.*, 2001).

1.9 Composição química e valor nutricional de vegetais da família Cruciferae

Um novo sistema de classificação de vegetais foi proposto por Cronquist (1988), no qual a família Cruciferae, do sistema de Engler (Joly, 1979), foi denominada Brassicaceae. No entanto, foi adotado neste trabalho o nome anterior, uma vez que as espécies desta família utilizadas como alimento são mais conhecidas como “crucíferas”, principalmente entre os pesquisadores da área de nutrição.

A família Cruciferae é representada por mais de 2.000 espécies, com exemplares importantes na dieta humana (Tabela 1) (Delaquis e Mazza, 1998). Só o mercado de *Brassica oleracea*, incluindo brócolis, couve de bruxelas, repolho e couve-flor, movimentou nos Estados Unidos, mais de US\$ 1 bilhão, entre 1996 e 1999. A colheita de brócolis foi a mais rentável, excedendo US\$ 500 milhões/ano, seguida pela do repolho e da couve-flor. Enquanto as estatísticas de produção e consumo de outros vegetais desta família nos Estados Unidos são escassas (Farnham, 2003), para o Brasil elas são inexistentes.

O incentivo ao consumo de vegetais em geral, e de crucíferas em particular, baseia-se no seu valor nutricional como fonte importante de vitaminas

antioxidantes (vitamina A, C, E, ácido fólico), presença de fibras e metabólitos especiais tais como carotenóides, cumarinas, flavonóides, glucosinolatos, compostos fenólicos e terpenos, alto teor de fibras e baixo teor de gordura (Delaquis e Mazza, 1998; Farnham, 2003; Nestle, 1998).

Tabela 1 – Espécies de vegetais da família Cruciferae e sua denominação popular, comumente presentes na dieta humana.

ESPÉCIE	NOME POPULAR
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.	Repolho branco
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> D.C.	Couve-manteiga
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L. subv. <i>cauliflora</i>	Couve-flor
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemmifera</i> DC	Couve de bruxelas
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L. subv. <i>cymosa</i>	Brócolis
<i>Raphanus sativus radiculat</i> L.	Rabanete
<i>Brassica napus</i> L. var. <i>napobrassica</i> L.	Nabo
<i>Brassica nigra</i> L.	Mostarda preta
<i>Sinapis alba</i> L.	Mostarda
<i>Raphanus sativus</i> L.	Rabanete
<i>Nasturtium officinalis</i> R. Br.	Agrião

Fonte: (Delaquis e Mazza, 1998)

Neste sentido, Kurilich e colegas (1999) ao avaliarem os teores de caroteno, tocoferol e ácido ascórbico presente nas partes comestíveis de 63 genótipos destes vegetais, incluindo brócolis (*B. oleracea* var. *itálica*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve (*B. oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*) e couve de bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), demonstraram que embora com variações consideráveis, a couve foi a que apresentou maior teor em vitaminas, seguida pelo brócolis e couve de bruxelas (Kurilich *et al.*, 1999).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que o tempo entre a colheita e o processamento do vegetal é fator determinante na manutenção da sua qualidade nutricional e ação antioxidante (Ou *et al.*, 2002; Verhoeven *et al.*, 1997; Willett, 1994).

1.10. Poder antioxidante de vegetais da família Cruciferae

A atividade antioxidante de alguns exemplares de crucíferas (brócolis, couve de bruxelas, couve-flor, couve e repolho) mensurada por ensaios espectrofluorimétricos, demonstrou diversa, porém pronunciada ação (Cao *et al.*, 1996). Llorach e colegas analisaram a atividade de um subproduto da couve-flor constituído, principalmente, de folhas e, em menor quantidade, talos em inibir a peroxidação lipídica (Llorach *et al.*, 2003). Esses resultados sugerem utilização potencial desses subprodutos como fonte de antioxidantes de custo acessível para a indústria, a qual poderia utilizá-los como ingredientes funcionais no enriquecimento de produtos alimentícios.

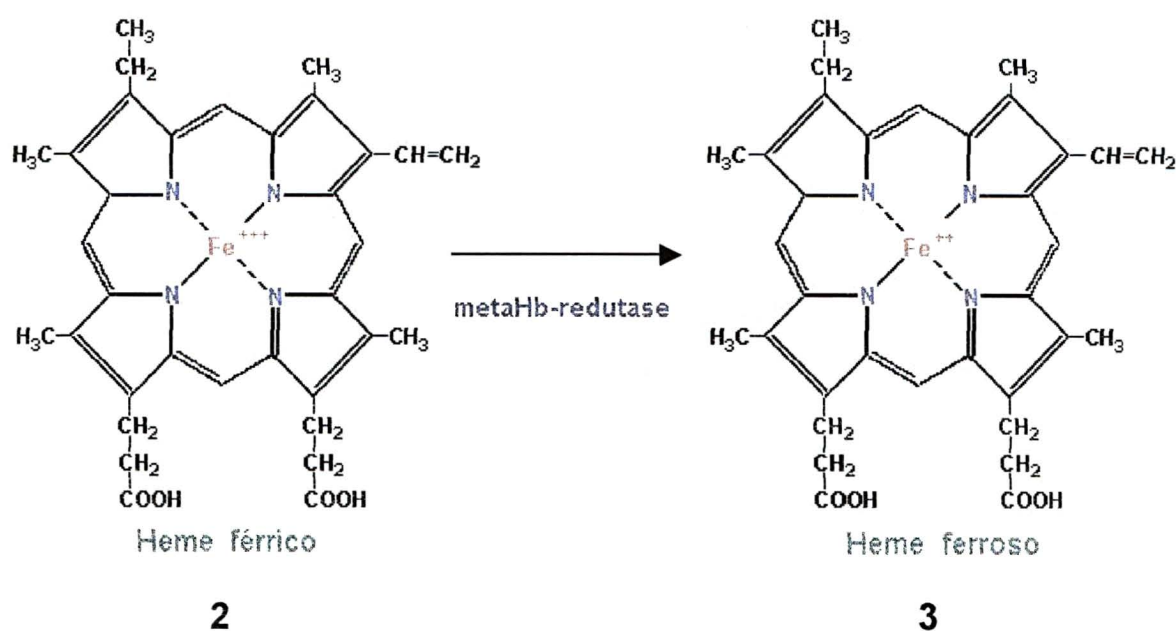
Extratos aquosos de couve de bruxelas cozidas e autolisadas, em contraste com o efeito de extratos *in natura*, inibiram a quebra das fitas de DNA de linfócitos humanos induzida pelo peróxido de hidrogênio *in vitro* (Zhu e Loft, 2001). Sucos obtidos de variedades de *Brassica oleracea* (brócolis, couve de bruxelas, repolho e couve-flor) demonstraram atividade antimutagênica induzida por aminas aromáticas heterocíclicas em *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 (Edenharder *et al.*, 1994). Estas substâncias são formadas durante a cocção de alimentos protéicos, como carnes e peixes, tendo sua ação mutagênica comprovada em diversos estudos (Colvin *et al.*, 1998; Krul *et al.*, 2000). Como os vegetais da família Cruciferae são também importantes fontes de tocoferóis e carotenos, é possível inferir que os seus efeitos benéficos estejam relacionados à sua ação antioxidante decorrente do efeito sinérgico ou aditivo entre as substâncias neles presentes.

1.11 O eritrócito humano e seu sistema antioxidante

O eritrócito humano maduro é uma célula altamente especializada, anucleada, na forma de disco bicôncavo, sem organelas, com diâmetro médio de 7,4 μm e que vive cerca de 120 dias na circulação periférica. Possui flexibilidade fisiológica notável conferida pela composição complexa de sua membrana. Sua

principal função fisiológica está no transporte de gases entre os tecidos e os pulmões, através da molécula de hemoglobina (Telen e Kaufman, 1999).

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globosa básica, com 64.500 Daltons, cuja principal função é a de transportar O_2 . Sua molécula é composta por uma parte protéica, constituída por quatro cadeias polipeptídicas, denominada globina. Cada uma destas cadeias contém o grupo prostético heme, constituído de uma protoporfirina (anel tetrapirrólico). No centro do anel insere-se um átomo de ferro (Fe), o qual deve estar na forma ferrosa **3** (Fe^{++}) para possibilitar o transporte de O_2 . Devido a exposição contínua à elevadas concentrações de O_2 , o Fe^{++} da Hb oxida-se vagarosamente à metahemoglobina (metaHb) **2**, uma proteína incapaz de carrear oxigênio, por possuir o Fe^{+++} . Para o restabelecimento da função da Hb, a metaHb deve ser reduzida pela enzima metaHb redutase (Telen e Kaufman, 1999).



O fato de o eritrócito maduro não possuir determinadas organelas implica na inexistência do ciclo de Krebs. Para sobreviver, esta célula utiliza fontes de

energia alternativas, principalmente a via glucolítica anaeróbia de Embden-Meyerhof e o ciclo das pentoses, ou via das hexoses monofosfato (Figura 5). Em situações normais, aproximadamente 90% da glucose é metabolizada pela via anaeróbia, enquanto que os 10% restantes seguem pela via aeróbia (Naoum, 1997; Telen e Kaufman, 1999). Enquanto a via glucolítica anaeróbia ocorre no citoplasma e gera duas moléculas de ATP para cada molécula de glucose degradada a lactato, o produto mais importante do ciclo das pentoses é o NADPH, que mantém os níveis de glutathiona reduzida (GSH) normais (Champe e Harvey, 1997).

Essa substância tem a capacidade de modular a reatividade de espécies reativas, freqüentemente formados, como por exemplo, H_2O_2 , neutralizando-os, em reação catalisada pela glutathiona peroxidase. Após a neutralização do radical livre, a glutathiona passa à forma oxidada (GSSG), destituída de propriedades protetoras. No entanto, a célula regenera a GSH em reação catalisada pela glutathiona redutase, utilizando o NADPH como fonte de elétrons. Assim, o NADPH fornece elétrons indiretamente para a redução do H_2O_2 (Champe e Harvey, 1997) ou outros radicais livres, constituindo um mecanismo de fundamental importância na proteção dos eritrócitos contra a sobrecarga oxidativa, sendo capaz de impedir a oxidação lipídica e de proteínas, em particular da Hb (Telen e Kaufman, 1999).

A geração de NADPH é o principal estímulo para a utilização de glucose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) pelo ciclo das pentoses. Alguns agentes redutores, tais como o azul de metileno, a cisteína ou o ascorbato, podem estimular em até vinte vezes o ciclo das pentoses, presumivelmente por causar a oxidação da GSH. Esta flexibilidade metabólica permite ao eritrócito responder a estresses oxidativos inesperados (Davidson e Tanaka, 1972; Halley, 1985; Stern, 1989; Tavazzi et al., 2000).

1.12 O eritrócito humano e o estresse oxidativo

O termo hemólise abrange todos os mecanismos diretos e indiretos que causam a destruição do eritrócito (Telen e Kaufman, 1999), diminuindo o seu tempo de vida na circulação. As lesões do eritrócito causadas por uma sobrecarga oxidativa são, geralmente, resultado final de dois processos: a oxidação e desnaturação da Hb e o ataque de radicais livres aos lipídeos e às proteínas da membrana.

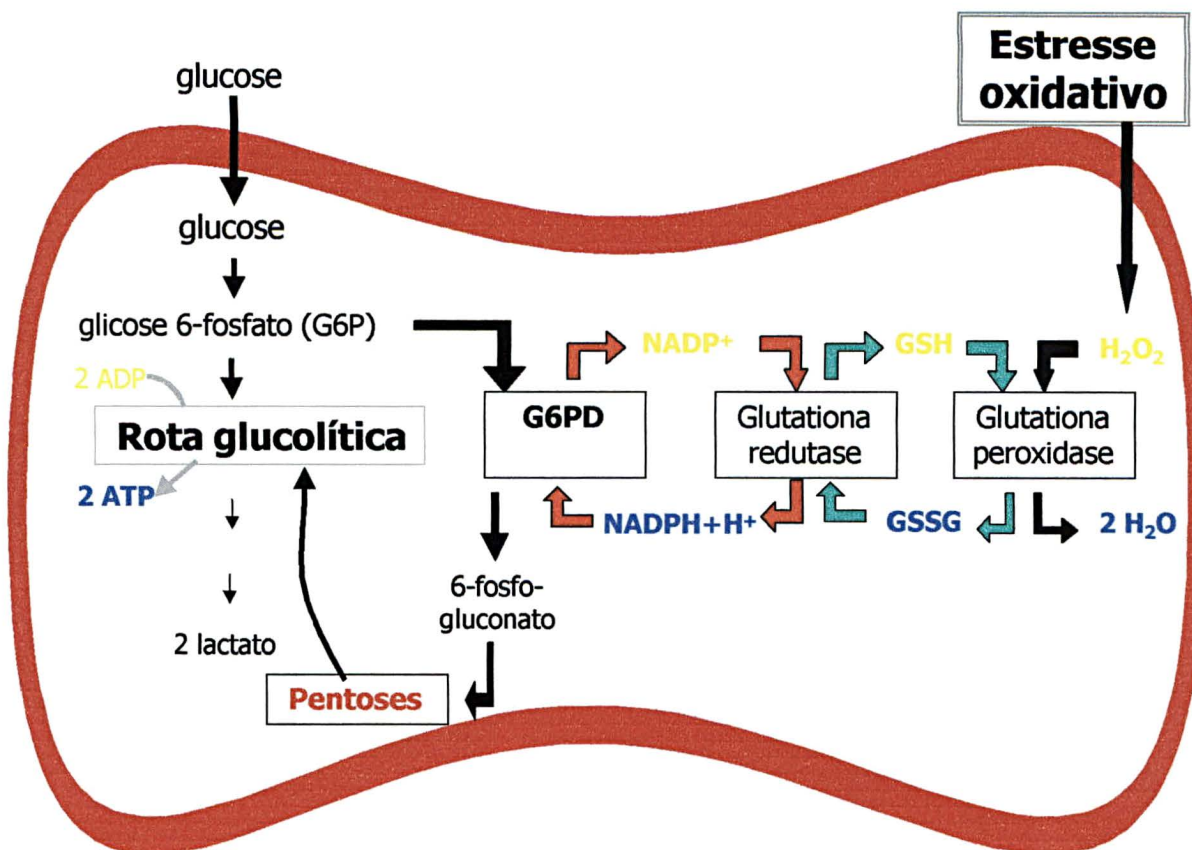


Figura 5. Metabolismo anaeróbico do eritrócito humano e sua interrelação com o ciclo das pentoses. Devido à inexistência de determinadas organelas, o eritrócito utiliza como fonte de energia vias alternativas (via glucolítica e o ciclo das pentoses). Na via glucolítica, são geradas duas moléculas de ATP para cada molécula de glucose. O ciclo da pentoses consome cerca de 10% da glucose, mas é de fundamental importância na manutenção dos níveis normais de NADPH, através da oxidação da glucose-6-fosfato, reação catalisada pela glucose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD). A glutathiona reduzida (GSH) pode neutralizar quimicamente radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em reação catalisada pela glutathiona peroxidase, formando glutathiona oxidada (GSSG). A célula regenera a GSH utilizando o NADPH como fonte de elétrons redutores.

Adaptado de Champe e Harvey, 1997.

Quando há sobrecarga das defesas antioxidantes do eritrócito, pode ocorrer hemólise devido à inabilidade do eritrócito em regenerar os componentes lesados (Hatherill *et al.*, 1991).

A oxidação da Hb envolve o compartilhamento de elétrons do Fe^{+2} do grupamento heme com o O_2 , levando a oxihemoglobina para a forma de superoxiferrihemoglobina. A reação é reversível e, quando o O_2 é liberado, a oxihemoglobina dissocia-se parcialmente em sua forma desoxigenada e O_2 . O radical O_2^{\bullet} também pode ser dissociado, causando a oxidação do Fe^{+2} para a forma Fe^{+3} , com produção de metahemoglobina (metaHb), também denominada de ferrihemoglobina, a qual também é gerada pela exposição da Hb ao H_2O_2 , pela dismutação do O_2 (Mansouri e Lurie, 1993; Telen e Kaufman, 1999). A velocidade de oxidação aumenta quando há um aumento de temperatura, diminuição do pH e na presença de fosfato orgânico ou íons metálicos (Telen e Kaufman, 1999).

O Fe^{+2} da Hb é exposto continuamente à elevadas concentrações de O_2 e oxida-se vagarosamente à metaHb, uma proteína incapaz de carrear oxigênio, como anteriormente referido. Para o restabelecimento da função da Hb, a metaHb em condições fisiológicas, é reduzida pela enzima NADH-metahemoglobina redutase² (metaHb redutase), a qual atua principalmente na presença de dois transportadores de elétrons: o citocromo b5 e o NADH. Uma pequena parte da metaHb é reduzida por sistemas não-enzimáticos, através do ácido ascórbico e da glutathione. O sistema de redução é altamente eficiente, sendo que, no sangue circulante, são encontradas quantidades insignificantes de metaHb (Atamna e Ginsburg, 1995; Mansouri e Lurie, 1993; Telen e Kaufman, 1999). Em eritrócitos normais, a produção diária de metaHb é menor que 1% da hemoglobina total devido ao equilíbrio entre produção e redução da mesma (Telen e Kaufman, 1999).

Quando o balanço entre a oxidação e a redução do heme é perturbado pela presença de excesso de oxidantes, diminuição da capacidade de sistema de redução (metaHb anormal que não responde à redução, deficiência do citocromo b5 redutase nos eritrócitos) ou pela presença de Hb anormais, ocorre um aumento de metaHb (Atamna e Ginsburg, 1995; Mansouri, 1985; Mansouri e Lurie, 1993).

² Sinônimos da metaHb redutase: citocromo b5 redutase, NADH desidrogenase, diaforase 1.

Como ilustrado na Figura 6, *in vitro*, durante uma desnaturação oxidativa, a metaHb pode ser convertida em hemicromos reversíveis, os quais podem ser reduzidos à Hb funcional. Porém, se o estresse continuar, ocorre produção de hemicromos irreversíveis, que precipitam junto com a globina e a hemina, formando os chamados corpos de Heinz (heinz, 1890), produtos finais de desnaturação oxidativa da Hb (Peisach *et al.*, 1975).

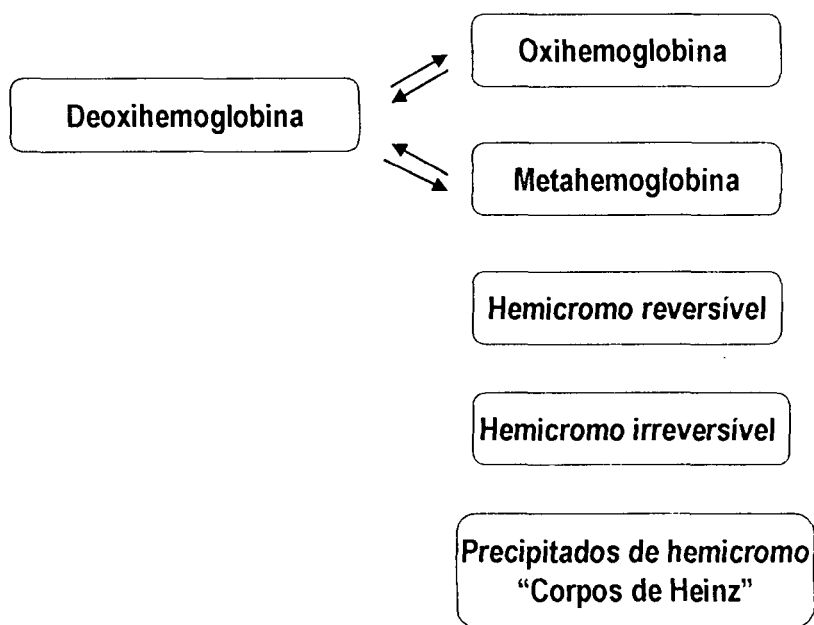


Figura 6. Formação de corpos de Heinz pela ação de espécies reativas de oxigênio. A metahemoglobina (metaHb) pode ser reduzida à desoxihemoglobina através da ação de enzimas e por outros mecanismos. No entanto, um aumento na sobrecarga oxidativa ou enfraquecimento das defesas antioxidantes, resulta em um aumento das espécies reativas de oxigênio. O radical superóxido é um dos principais responsáveis pelo processo de oxidação da hemoglobina, levando à formação de metaHb e, posteriormente, formação de hemicromos que se ligam à membrana e evoluem para a forma de corpos de Heinz, destruindo a membrana e provocado hemólise do eritrócito.

1.13 Eritrócitos sob ação de drogas oxidantes

Substâncias como a acroleína, dapsona, cloridrato de fenil-hidrazina (Fh), *terc*-butil hidroperóxido e isouramil geram espécies reativas de O₂ no interior dos eritrócitos e, desta forma, podem causar danos oxidativos aos lipídeos e proteínas, ou mesmo produzir metaHb (Ciccoli *et al.*, 1994; Ferrali *et al.*, 1997; Stern, 1989). O mesmo pode ocorrer com o uso de alguns medicamentos, como por exemplo, o acetaminofeno e algumas drogas utilizadas no tratamento do câncer, como a hidroxiuréia (Malec, 1984).

A fenil-hidrazina (Fh) é um exemplo clássico de droga que induz dano oxidativo nos eritrócitos de indivíduos saudáveis, interagindo diretamente com essas células, formando espécies reativas, que podem provocar desnaturação oxidativa da Hb e efeitos deletérios sobre as proteínas e lipídeos da membrana (Chakrabarti *et al.*, 1995; Misra e Fridovich, 1976; Stern, 1989).

1.14 Métodos experimentais de avaliação da atividade antioxidante

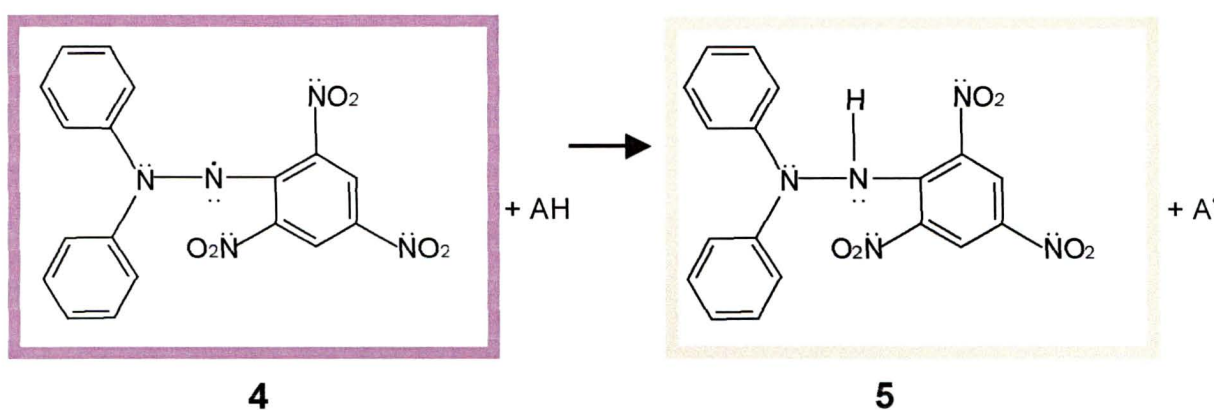
A atividade antioxidante de uma substância não pode ser mensurada diretamente, mas através dos seus efeitos sobre um substrato ou sistema passível de ser monitorado. A maioria desses métodos usa processos oxidativos, que envolvem a adição de um agente iniciador, como a temperatura, agitação ou uma pressão parcial de O₂, um metal de transição ou mesmo exposição à luz, para acelerar o processo, e uma fonte de radicais livres específica. Esses radicais são, então, oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação, ou sua extensão, medido (Antolovich *et al.*, 2002).

Muitos métodos e modos de expressar a atividade antioxidante de extratos obtidos de plantas e vegetais têm sido utilizados, onde o efeito de várias concentrações é comparado ao efeito exercido por uma substância de referência, como as vitaminas C ou a E, ou mesmo um composto puro, como a quercitina e a rutina. Contudo, como recentemente destacado por Antolovich e colegas (2002), distinção entre atividade antioxidante e capacidade antioxidante deve estar presente quando se interpreta os resultados, uma vez que esta refere-se à somatória de todas as atividades antioxidantes exercidas individualmente por cada componente presente em uma mistura, como é o caso de extratos.

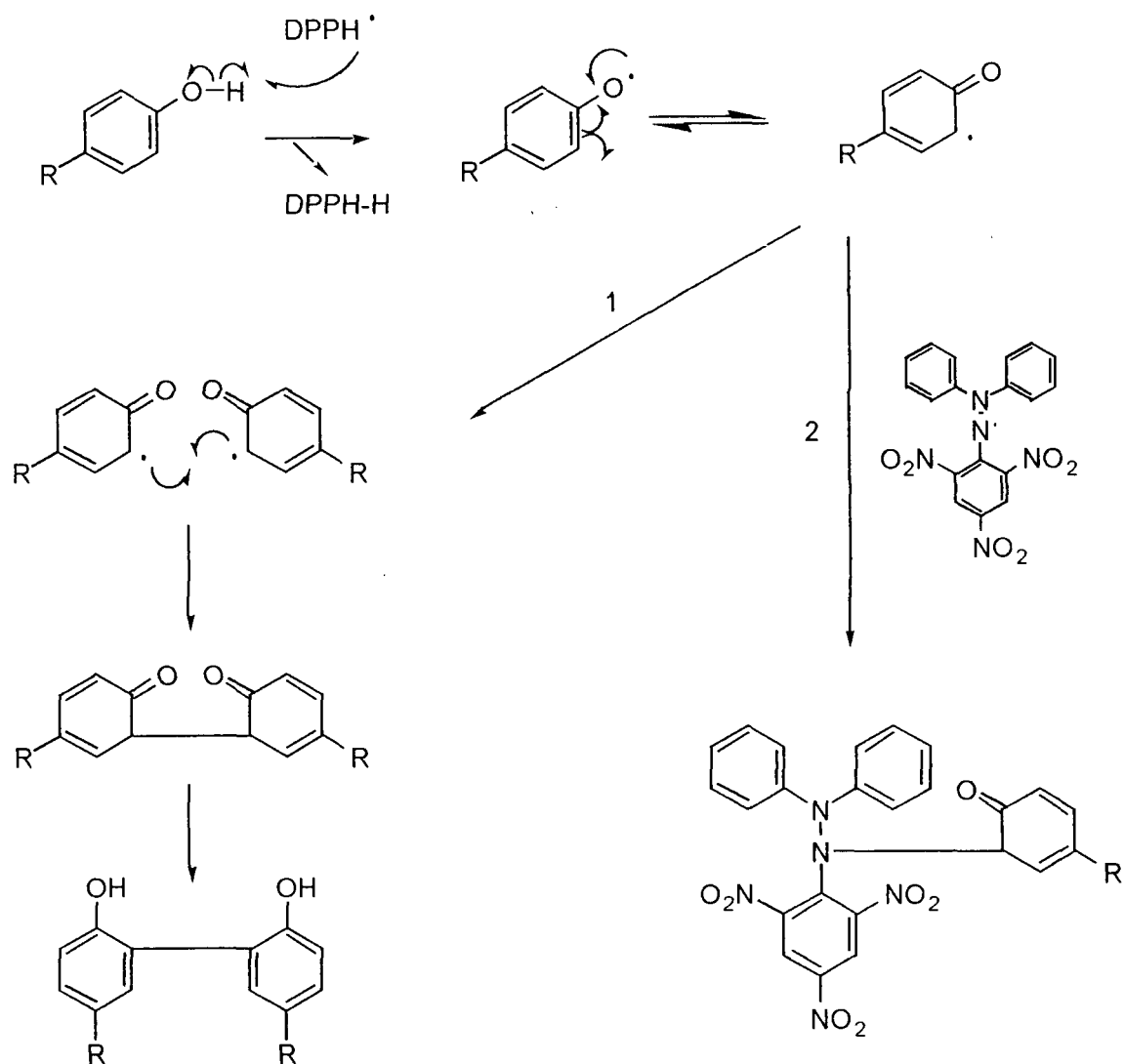
1.14.1 Métodos químicos

Dentre os métodos químicos, destaca-se o método que utiliza o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) **4**, o qual é um radical livre estável (DPPH[•]) que, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina **5** (Koleva *et al.*, 2002).

Esta redução pode ser acompanhada espectrometricamente em 518 nm, pela diminuição da absorvância, com simultânea mudança da coloração violeta escura original da solução para amarela (**4-5**), descorando à medida que a reação com a solução teste se processa. Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH[•] residual, mensurado após certo tempo, corresponde inversamente à capacidade antioxidante da substância analisada.



Os mecanismos de reação propostos para o método do DPPH[•], descritos por Brand-Williams e colaboradores (1995, 1997) para substâncias fenólicas e ilustrados em seguida, parecem envolver, de forma isolada ou combinada, a [1] dimerização entre dois radicais fenoxil, seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH[•] e [2] uma molécula de DPPH[•] pode complexar-se com um radical aril.



Esquema 1. Proposta de mecanismos de reação para substâncias fenólicas com DPPH (Brand-Williams, 1995).

[1] dimerização entre dois radicais fenoxil, seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH• e [2] uma molécula de DPPH• pode complexar-se com um radical aril, os quais podem ocorrer de forma isolada ou combinada.

O método do DPPH mostra-se como uma alternativa rápida, pois ocorre em aproximadamente 30 min, de custo praticável por utilizar reagentes acessíveis e por não necessitar de equipamentos sofisticados. Além disso, neste método, a eficiência antioxidante é mensurada em temperatura ambiente, eliminando-se o risco potencial de degradação térmica de algumas das substâncias analisadas (Bondet *et al.*, 1997).

Outro método freqüentemente usado para avaliar a atividade antioxidante é o ensaio do fosfomolibdênio, o qual baseia-se na redução do Mo^{+6} para Mo^{+5} , com subsequente formação de um complexo fosfato- Mo^{+5} , distinto por sua coloração verde em pH ácido, com absorção máxima em 695 nm (Lu e Food, 2001; Prieto *et al.*, 1999). Em contraste com o método do DPPH acima descrito, esta reação se processa a temperaturas elevadas e por tempo prolongado (Prieto *et al.*, 1999).

1.14.2 Sistemas biológicos

Devido ao reconhecido efeito dos radicais livres contribuindo na patogênese das várias doenças humanas (Holley e Cheeseman, 1993), com conseqüências, muitas vezes, devastadoras, a procura por substâncias que possam atenuar ou mesmo impedir suas ações tem se ampliando, assim como os métodos para avaliar o potencial antioxidante dessas substâncias, de origem natural ou sintética.

De maneira geral, pode-se estudar os efeitos protetores de antioxidantes através de sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*. Para ambos, é necessário, como relatado para os métodos químicos, estabelecer-se modelos de indução de oxidação, selecionar o agente indutor do dano oxidativo e o modo de se mensurar o efeito exercido pelo(s) antioxidante(s) ou sua extensão (Lon *et al.*, 1999). Porém, em contraste com os métodos químicos, os radicais livres biológicos de interesse são extremamente reativos e de vida curta, pois, sendo produzidos *in vivo*, reagem no local ou próximo à sua fonte de geração. Conseqüentemente, sua atividade é, usualmente, medida por métodos indiretos, onde se avalia a interação desses com componentes lipídicos ou protéicos das células. Além disso, quando substâncias antioxidantes são administradas em animais ou humanos, o ambiente químico no qual atuam é altamente controlado e seus níveis

são limitados pelos seus índices de absorção e excreção. Assim, há maiores dificuldades em induzir-lhes um estresse oxidativo ou medir seu efeito (Anderson e Phillips, 1999).

As técnicas atualmente disponíveis para a medição do efeito dos antioxidantes frente à ação de radicais livres *in vivo* são, assim, limitadas a ensaios semiquantitativos do dano oxidativo residual imposto a diferentes classes de biomoléculas (Holley e Cheeseman, 1993). Por exemplo, tecidos são mantidos sob condições constantes de estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes endógenas pode ser mensurada, possibilitando a investigação dos efeitos exercidos pelo antioxidante em teste (Anderson e Phillips, 1999).

Os métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante são muito sensíveis ao ambiente químico em que eles ocorrem, particularmente na concentração de oxigênio, presença de metais de transição e de numerosos compostos 'redox' ativos (Anderson e Phillips, 1999). Dessa forma, vários testes podem ser utilizados como, por exemplo, os sistemas xantina-xantina oxidase (Chang *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1993), peroxidação do ácido linolêico (Kuo *et al.*, 1999), substâncias reativas aos produtos de oxidação do ácido tiobarbitúrico (TBA) (Holley e Cheeseman, 1993).

Recentemente, os efeitos protetor e oxidante da vitamina C sobre o estresse oxidativo induzido pela Fh em eritrócitos humanos foi investigado através dos níveis de metaHb formada (Claro, 2002), assim como a prevenção na formação de corpos de Heinz e depleção de GSH induzido por *terc*-butilhidroxiperoxido (TBH) pelo extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, rutina e quercitina (Comar, 2002). Devido às propriedades morfofisiológicas, relativa estabilidade quando preservados *in vitro* e, principalmente, facilidade de obtenção (Ferrali *et al.*, 1992), este sistema tornou-se alvo de interesse com a finalidade de se estabelecer um sistema biológico alternativo que se aplicasse ao estudo da atividade antioxidante de extratos de vegetais e plantas medicinais.

Assim, no presente trabalho, a capacidade antioxidante de extratos obtidos de crucíferas foi investigado usando-se os métodos químicos do fosfomolibdênio e do DPPH. Ainda, estudou-se o sistema antioxidante natural dos eritrócitos humanos e a influência das culturas convencional, orgânica e hidropônica na ação antioxidante exercida por esses extratos.

Objetivos

São objetivos gerais deste projeto:

- Avaliar a capacidade antioxidante de extratos de vegetais da família Cruciferae usados na dieta regular, obtidos de diferentes cultivos, utilizando métodos químicos e um sistema biológico.

Objetivos Específicos

1. Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante dos extratos aquosos de *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (repolho branco), de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC (couve-manteiga), de *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cauliflora* (couve-flor), de *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa* (brócolis), de *Nasturtium officinalis* (agrião) e de *Raphanus sativus radicular* (rabanete), usando o método de redução pelo fosfato de molibdênio, tendo a vitamina C e a rutina como substâncias de referências.
2. Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC (couve-manteiga) e *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa* (brócolis), mediada pelo radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), antes e após a retirada da clorofila e substâncias lipofílicas, tendo a vitamina C como referência.
3. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC (couve-manteiga) e *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa* (brócolis), usando os mecanismos antioxidantes naturais do eritrócito humano mediados pela hemoglobina contra o estresse oxidativo induzido pela fenil-hidrazina.
4. Avaliação da influência dos cultivos convencional, hidropônico e orgânico sobre a capacidade antioxidante de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC (couve-manteiga) e *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa* (brócolis).

Justificativa

Há consenso entre profissionais da área da saúde (nutricionistas, médicos, farmacêuticos etc), pesquisadores, indústrias de alimentos e consumidores da inter-relação entre dieta e saúde e que a ingestão de alimentos ricos em fibras, pobres em gorduras e alimentação predominantemente à base de frutas e verduras diminuem o risco de doenças crônicas como artrite, câncer, osteoporose e corionariopatias (Cândido e Campos, 1995; WCRF, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que a atividade antioxidante de compostos presentes em uma dieta regular concorre para com a redução do risco de desenvolvimento de certas doenças degenerativas. Além disso, observa-se um aumento das evidências sobre os efeitos protetores que exercem as substâncias presentes nos vegetais tais como os flavonóides, folatos, carotenóides e glucosinolatos (Dekker *et al.*, 2000), demonstrados através de ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro*. Baseado nessas observações, o comitê do *World Cancer Research Fund* e o *Institute for Cancer Research* recomendam o consumo diário de 400 a 800 g de frutas e verduras (WCRF, 2002).

A ingestão de vegetais da família Cruciferae como parte de uma dieta balanceada poderia, então, ser uma fonte alternativa efetiva de substâncias contra o estresse oxidativo imposto ao organismo humano diariamente. Devido à diversidade desses vegetais presentes na dieta regular dos brasileiros e aos efeitos biológicos relacionados com seu consumo, torna-se relevante avaliar-se a capacidade antioxidante de alguns exemplares, assim como investigar se diferentes técnicas de cultivo podem influenciar essa atividade.

Metodologia

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são pró-análise. No preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura, obtida pelo sistema Puritech/Permutation. Todos os solventes foram purificados antes do uso (Perrin *et al.*, 1966).

Para o preparo das soluções utilizou-se balança analítica Belmark 210-A e pHmetro Mettler MP220, sendo o pH das soluções ajustado com solução NaOH N quando necessário. As soluções foram armazenadas em temperatura de 4-8°C, salvo indicação contrária.

A homogeneização das amostras se deu por rotação em aparelho Phoenix Hs e, para a separação dos eritrócitos, utilizou-se centrífuga Sigma 4K15. As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601.

Para as cromatografias em camada delgada, utilizou-se cromatoplasas de sílica, pré-ativadas com fase estacionária Kieselgel 60 (F₂₅₄, Merck), visualizadas sob luz ultravioleta (UV).

2.1 Soluções

- **Solução reagente para ensaio antioxidante pelo método do complexo fosfomolibdênio:** ácido sulfúrico (0,6 M), fosfato de sódio (28 mM) e molibdato de amônio (4 mM) em água.
- **Solução reagente para ensaio antioxidante da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH):** 0,3 mM em etanol.
- **Solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4** (Ciccoli *et al.*, 1994; Ferrali *et al.*, 1997): NaH₂PO₄.2H₂O (123 mM), Na₂HPO₄ (27 mM) e NaCl (123 mM) em água.
- **Solução salina tamponada com fosfato (PBS) e glucose, pH 7,6:** PBS acrescido de glucose (200 mg/dl).

- **Tampão fosfato M/15 pH 6,6:** K_2HPO_4 (67 mM) e KH_2PO_4 (67 mM) em água.
- **Tampão fosfato M/60:** diluição 1:4 (v/v) do tampão fosfato M/15.
- **Solução de ácido acético 12% (v/v):** CH_3CO_2H (1,2 ml) em água (8,8 ml).
- **Solução de cianeto de sódio 10% (p/v):** NaCN (1 g) em água (10 ml). Para o preparo de cianeto de sódio neutralizado procedeu-se diluição 1:1 (v/v) com ácido acético 12%.
- **Solução de ferricianeto de potássio 20% (p/v):** $K_3[Fe(CN)_6]$ (2 g) em água (10 ml).
- **Solução de hexametilenotetramina 0,5% (p/v):** hexametilenotetramina (250 mg) em água (50 ml).
- **Solução de ácido clorídrico 25% (v/v):** HCl (25 ml) em água (100 ml).
- **Solução de ácido acético glacial 5% (v/v):** CH_3CO_2H (5 ml) em metanol 100 ml.
- **Reativo de cloreto de alumínio 20% (p/v):** $AlCl_3$ (20 g) em solução de ácido acético glacial 5 % (100 ml).

2.2 Material vegetal

Os vegetais *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L (repolho branco), *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC (couve-manteiga), *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cauliflora* (couve-flor), *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa* (brócolis), *Nasturtium officinalis* (agrião) e *Raphanus sativus radicular* (rabanete), todos da família Cruciferae, foram gentilmente cedidos pelos produtores conforme discriminado a seguir:

- cultura convencional: couve-manteiga, couve-flor, rabanete, brócolis e repolho (Ovos Agro, São José dos Pinhais/PR);
- cultura orgânica: couve-manteiga, couve-flor, rabanete, brócolis e repolho (Chácara Fruto da Terra, Colombo /PR);
- vegetais hidropônicos: couve-manteiga e agrião (Irmãos Lazarotto, Colombo/PR).

Os exemplares foram coletados em 17 de maio de 2003 acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo encaminhados imediatamente para o laboratório, onde os vegetais foram fracionados em triturador marca Philips e armazenados à temperatura de -10°C. O tempo entre a colheita, o processamento e o armazenamento foi inferior a 8 h. A identificação dos vegetais foi fornecida pelos produtores no dia da coleta, bem como os defensivos utilizados, os quais não estão listados neste trabalho por ser de caracter particular para cada tipo de vegetal e técnica de cultivo empregada.

2.3 Determinação do teor em umidade

Uma alíquota de cada vegetal *in natura* (25 g) foi levada à secura em estufa de circulação de ar modelo Fanem 315-SE (50 °C/4 h) para determinação do teor de umidade, o qual foi obtido pela diferença entre o peso inicial do vegetal e seu peso após secagem. O material seco foi usado para obtenção do extrato aquoso, o qual foi utilizado para realização do ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio.

2.4 Preparação dos extratos

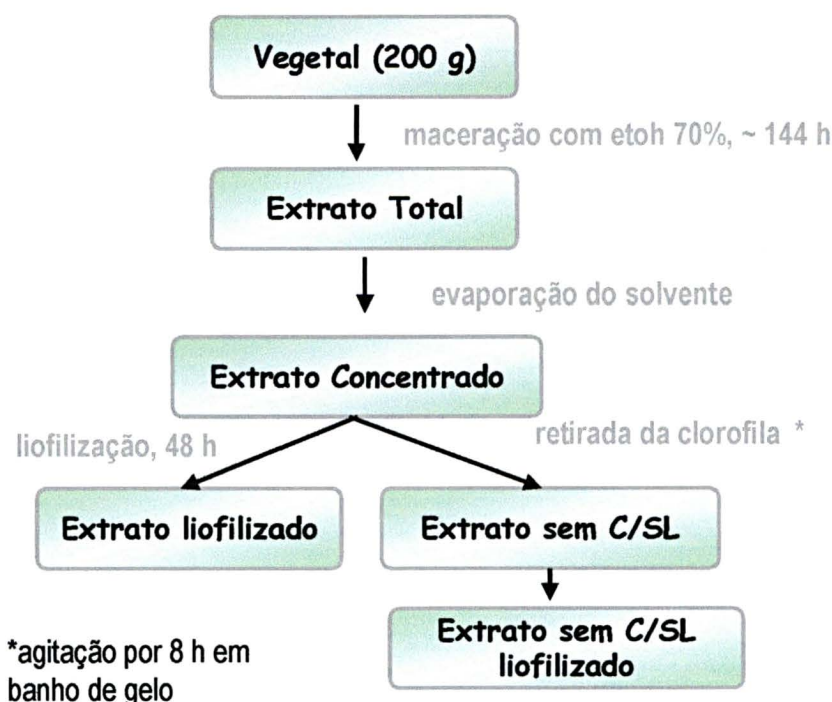
2.4.1 Extrato aquoso

Os extratos aquosos foram usados para os ensaios de redução do complexo fosfomolibdênio. Para tanto, preparou-se infusões com o material seco (1,25 g) em água fervente (25 ml), por 30 min. Em seguida, foram filtrados e

transferidos para balão volumétrico, sendo o volume final ajustado para 50 ml com água (concentração final de 2,5%).

2.4.2 Extrato etanólico

Os extratos etanólicos foram utilizados para os ensaios de redução do DPPH, onde os vegetais *in natura* (200 g), previamente fracionados, foram macerados por 6 dias em funil de separação, utilizando-se um sistema solvente composto por etanol-água (7:3), sendo que após este período houve visualmente a descoloração dos extratos. Os extratos obtidos após a evaporação do solvente em rotavapor sob pressão reduzida e temperatura inferior a 50 °C, foram divididos em duas frações: uma para liofilização e a outra, para eliminação da clorofila e substâncias lipofílicas (C/SL), seguida de liofilização (Fluxograma 1). Os extratos vegetais foram liofilizados em aparelho Labconco, permanecendo armazenados a -18 °C até o momento do uso.



Fluxograma 1 - Esquema geral de obtenção de extrato etanólico das crucíferas usadas neste trabalho.

C/SL: extrato após retirada de clorofila e substâncias lipofílicas.

2.4.3 Eliminação da clorofila e de substâncias lipofílicas dos extratos de crucíferas (Santos, 2003)

Frações liofilizadas dos extratos (7 g) foram suspensas em água (70 ml). Após 8 h de agitação mecânica contínua em banho de gelo seguida de repouso refrigerado por 12 h, observou-se deposição da clorofila junto com material lipofílico nas laterais e fundo do recipiente, os quais foram retirados por filtração em funil de Büchner utilizando-se papel filtro. Em seguida, as frações foram liofilizadas e conservados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento do uso.

2.5 Abordagem do potencial antioxidante dos extratos por cromatografia de camada delgada (Conforti *et al.*, 2002; Wagner e Bladt, 1996)

Foram aplicados 10 μl de rutina (1 mg/ml), usada como padrão, e os extratos de couve-manteiga e brócolis (10 mg/ml) foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), usando-se, como fase móvel, acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26). Em seguida, as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH em etanol e fotografadas com auxílio de câmara digital Canon A102.

2.6 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio (Prieto *et al.*, 1999)

Extratos aquosos (200 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 ml) foram adicionados de solução reagente do complexo fosfomolibdênio (1 ml) e incubados por 90 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após resfriamento, procedeu-se a leitura em 695 nm para obtenção das absorvâncias, usando-se água como branco. A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em relação a vitamina C (200 $\mu\text{g/ml}$) usado como padrão, e rutina (200 $\mu\text{g/ml}$) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00.

2.7 Ensaio de redução do radical livre DPPH

Este ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Koleva e colaboradores (Koleva *et al.*, 2002) com modificações propostas por Choi e colegas (Choi *et al.*, 2002). Dessa forma, a vitamina C (200 $\mu\text{g/ml}$) como padrão e concentrações de 0,01 a 10 mg/ml dos extratos de vegetais liofilizados foram preparadas em etanol (p/v – 2,5 ml), tratadas com solução de DPPH (1,0 ml) por 30 min a temperatura ambiente e a absorvância das amostras obtidas em 518 nm

contra um branco específico para cada concentração (2,5 ml de extrato e 1,0 ml de etanol). Como controle, utilizou-se uma solução de etanol (2,5 ml) e de DPPH (1,0 ml). Os resultados estão apresentados como a percentagem de DPPH* consumido, obtida segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de DPPH}^* \text{ consumido} = 100 - \{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{controle}}\}$$

2.8 Ensaio de inibição de formação de metahemoglobina induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina (Fh) em eritrócitos humanos, segundo Evelyn (Evelyn e Malloy, 1938) modificado por Beutler (Beutler *et al.*, 1995)

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa após consentimento livre e esclarecido (Anexo A), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo B).

2.8.1 Obtenção e isolamento de eritrócitos humanos (Ciccoli *et al.*, 1994; Ferrali *et al.*, 1997)

Sangue venoso humano (20 ml) anticoagulados com EDTA-K₃, coletado de voluntários adultos considerados saudáveis por não apresentarem nenhum sinal ou sintoma de enfermidade, com idade variando entre vinte e cinquenta anos, foi centrifugado (25 min, 800 g) a temperatura ambiente, para retirada do plasma e da camada leucocitária, sendo, em seguida, lavado (5 min, 800 g) duas vezes com PBS. Os eritrócitos foram, então, ressuspensos em PBS e o volume globular ajustado para 35%, usando-se o método do microhematócrito (Dacie e Lewis, 1995).

2.8.2 Tratamento das amostras (Claro, 2002; Ferrali *et al.*, 1997)

Aliquotas da suspensão de eritrócitos (1 ml) foram tratadas com solução de vitamina C (concentração final 20mM) ou com extratos vegetais (concentrações finais de 0,01 a 100 mg/ml), por 1 h sob homogeneização contínua ou com solução de cloridrato de fenil-hidrazina (concentração final 1 mM), por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua, após serem aeradas com

auxílio de pipeta *Pauster*. Em alguns experimentos, primeiramente, tratou-se os eritrócitos com vitamina C ou com diferentes concentrações dos extratos por 30 min a temperatura ambiente e, em seguida, com solução de Fh por 20 min, ambos sob homogeneização contínua.

2.8.3 Obtenção dos fatores FA, FB e FD (Beutler *et al.*, 1995)

Alíquotas de sangue total (50 µl) recém coletados foram diluídas em tampão fosfato M/60 (5 ml) e adicionadas de solução de ferricianeto de potássio 20% (25 µl). Após homogeneização por 5 min a temperatura ambiente, as absorvâncias da metaHb formada foram obtidas em 630 nm (FA), contra água. Em seguida, adicionou-se cianeto neutralizado (25 µl) e, após 5 min de repouso, procedeu-se nova leitura em 630 nm (FB), usando-se água como branco. Nesta etapa a metaHb desaparece.

Alíquotas das soluções anteriores (1 ml) foram transferidas para outra série de tubos contendo tampão fosfato M/15 (4 ml) e soluções de ferricianeto de potássio 20% (25 µl) e de cianeto de sódio 10% (25µl) foram adicionadas. Após homogeneização, realizou-se leitura da cianometahemoglobina a 540 nm (FD), utilizando-se, como branco, uma solução de tampão fosfato M/15 (10 ml), solução ferricianeto de potássio 20% (50 µl) e cianeto de sódio 10% (50 µl). Os resultados foram obtidos segundo a fórmula abaixo e cada fator obtido corresponde à média aritmética de quatro determinações independentes.

$$FB = \frac{D \times 100}{A - B}$$

Onde:

A: absorvância obtida em 630 nm, leitura da metaHb

B: absorvância obtida em 630 nm, desaparecimento da metaHb

D: absorvância obtida em 540 nm, leitura da cianometahemoglobina

2.8.4 Determinação da formação de metahemoglobina (metaHb)

Em tubo de ensaio, adicionou-se tampão fosfato M/60 (5 ml) e suspensão de eritrócitos (50 µl) previamente tratados ou não com Fh, vitamina C ou com diferentes concentrações dos extratos de crucíferas. As amostras foram homogeneizadas por 5 min a temperatura ambiente e as absorvâncias para metahemoglobina foram obtidas em 630 nm, utilizando-se água como branco (A). Em seguida, adicionou-se cianeto neutralizado (25 µl) em cada amostra, homogeneizou-se e, após 5 min de repouso, procedeu-se nova leitura em 630 nm, utilizando-se água como branco (B).

Aliquotas das soluções anteriores (1 ml) foram transferidas para outra série de tubos contendo tampão fosfato M/15 (4 ml), onde adicionou-se solução de ferricianeto de potássio 20% (25 µl) e de cianeto de sódio 10% (25 µl). Após homogeneização e repouso a temperatura ambiente por 5 min, realizou-se leitura em 540 nm (D), utilizando-se, como branco, uma mistura de tampão fosfato M/15 (10 ml), solução ferricianeto de potássio 20% (50 µl) e cianeto de sódio 10% (50 µl).

A concentração de metahemoglobina foi determinada de acordo com a fórmula abaixo:

$$MetaHb\% = \frac{A - B}{D} \times FB$$

Onde:

A: absorvância obtida em 630 nm, leitura da metaHb

B: absorvância obtida em 630 nm, desaparecimento da metaHb

D: absorvância obtida em 540 nm, leitura da cianometahemoglobina

FB: fator variável de acordo com o espectrofotômetro utilizado

2.9 Pesquisa de flavonóides

2.9.1 Método qualitativo:

- *Reação de Shinoda*: aos extratos etanólicos de crucíferas foram adicionados fragmentos de magnésio metálico e, vagarosamente pelas paredes do tubo de ensaio, adicionou-se HCl concentrado (2 ml). A positividade da reação, dada pela formação de cianidina, foi monitorada minutos após a reação, através do aparecimento de coloração vermelha.
- *Reação com $AlCl_3$* : áreas distintas de papel filtro foram umedecidas (1) somente com gotas do extrato ou com (2) gotas de extrato juntamente com solução de $AlCl_3$ a 5% (p/v) ou (3) somente com gotas de solução de $AlCl_3$ a 5% (p/v) e observadas sob luz UV (360 nm). A positividade da reação foi caracterizada pelo desenvolvimento de fluorescência na área umedecida com extrato e solução reagente.

2.9.2 Doseamento de flavonóides totais (Suisse, 1995)

Extratos liofilizados de couve-manteiga e brócolis, com e sem clorofila, foram exatamente pesados (0,3 g) e colocados em balão contendo soluções de hexametilenotetramina 0,5% (1 ml), solução de HCl 25% (2 ml) e acetato de etila (20 ml). Os flavonóides foram extraídos após aquecimento por refluxo durante 30 min, seguido de resfriamento e filtração. Para proporcionar maior extração dos flavonóides, o resíduo obtido da extração foi tratado duas vezes com acetona (20 ml) sob refluxo (10 min). Os filtrados foram, então, reunidos e o volume ajustado para 100 ml com acetona. Deste, uma alíquota (20 ml) foi particionada com água (30 ml) e acetato de etila (4 x 10 ml). Após descarte da fase aquosa, a fase orgânica foi transferida para um balão volumétrico, ajustando-se o volume para 50 ml com acetona, obtendo-se a *solução A*.

Solução teste: transferiu-se uma alíquota da solução A (10 ml) para balão volumétrico contendo solução de cloreto de alumínio (1 ml) e ajustou-se o volume para 25 ml com ácido acético glacial em metanol a 5%. Após 30 min de repouso, obteve-se a absorvância da solução teste em 422 nm em relação ao branco (10

ml da solução A e 15 ml de ácido acético glacial em metanol). O teor total de flavonóides da amostra analisada foi determinado segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ flavonóides} = \frac{A \times 1,25}{m}$$

Onde:

A: absorvância em 422nm; m: massa da amostra em gramas

2.10 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm 1 desvio padrão da média (DP) para um número de amostra (n) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o teste *t* de Student, o teste de regressão simples e intervalos de confiança, quando indicado e foram considerados significativos quando $p \leq 0,005$.

Resultados e Discussão

É inquestionável atualmente que o sistema de produção convencional de alimentos tem deixado resíduos de agrotóxicos em níveis preocupantes para a saúde pública. Uma pesquisa recente realizada pela ANVISA em parceria com a Fiocruz, revelou que, após analisar amostras de frutas e verduras nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco, 81,2% delas continham resíduos de agrotóxicos e, destas, mais de 22% apresentavam resíduos acima do limite permitido (ANVISA, 2001).

Diante deste cenário, justifica-se o aumento no número de consumidores de alimentos produzidos com tecnologias alternativas, motivados por aspectos relacionados à saúde e à preservação do meio ambiente, destacando-se aqueles obtidos de cultivo orgânico, embora ainda não haja um consenso sobre a superioridade nutricional desses alimentos em relação aos demais (Darolt, 2003).

Vegetais são fundamentais na dieta do homem devido ao seu valor nutricional como fonte relevante de antioxidantes, substâncias capazes de combater a ação oxidante de muitas substâncias (Guo *et al.*, 2001; Ramarathnam *et al.*, 1995; Steinkellner *et al.*, 2001; Steinmetz e Potter, 1996). Por essa razão, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) recomenda o consumo de vegetais, com destaque aos da família Cruciferae, devido, principalmente, ao seu conteúdo em vitamina C, ácido fólico, flavonóides e carotenóides (Farnham, 2003). Parece haver, também, uma associação inversa entre o consumo adequado de frutas e verduras e a redução do risco de desenvolver doenças crônico-degenerativas. Estas ações benéficas estão, provavelmente, associadas à presença de várias substâncias nesses alimentos, incluindo aquelas dotadas de atividade antioxidante como, por exemplo, as vitaminas C e E, carotenóides, licopenos e flavonóides.

Existem antioxidantes sintéticos como o BHT ou o BHA, contudo seu uso têm sido restrito devido à sua toxicidade e aos riscos à saúde. Assim, torna-se

relevante o uso de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos (Mansour e Khalil, 2000). A proposta do presente trabalho foi a de investigar a influência de diferentes técnicas de cultivo sobre o potencial antioxidante de extratos de crucíferas, utilizando-se dois métodos químicos regularmente empregados. Além disso, usou-se o eritrócito humano como modelo experimental alternativo, com a finalidade de se propor um sistema biológico eficaz, sensível e acessível que pudesse, em paralelo aos ensaios químicos convencionais, atestar as propriedades antioxidantes de extratos vegetais.

Para tanto, foram selecionados seis crucíferas que, além de fazerem parte da dieta regular humana e estarem disponíveis para consumo sob diferentes tipos de cultivo, também pudessem ser colhidas e processadas no mesmo dia, evitando alterações ou deterioração de seu conteúdo. Dessa forma, repolho branco, couve-manteiga, couve-flor, brócolis, agrião e rabanete, obtidos de culturas convencional, hidropônica e orgânica quando possível e de diferentes fornecedores foram colhidos, transportados em baixas temperaturas e processados em menos de oito horas.

Como garantia dessa operação, o teor de umidade de cada vegetal foi verificado, pois este parâmetro tem sido empregado quando se deseja certificar a qualidade de vegetais e frutas. O teor em água aumentado indica, geralmente, adulteração do produto (Ascar, 1985), enquanto valores dentro de intervalos de referência traduzem adequação nos procedimentos de coleta, transporte e armazenamento desses produtos, tornando-os apropriados para o consumo e, no caso particular deste trabalho, aptos a terem suas propriedades antioxidantes investigadas.

3.1 Teor de umidade

A Tabela 2 apresenta o teor de umidade das crucíferas estudadas, determinado após secagem em estufa (Metodologia, item 2.3). Dentre os três tipos de cultura analisados, pode-se observar que os vegetais de culturas hidropônica e convencional apresentaram maior conteúdo aquoso em relação aos cultivados organicamente ($p \leq 0,005$), como exemplificado pelos brócolis, onde teores de umidade de $84,7 \pm 0,03\%$ e $82,9 \pm 0,01\%$ nas culturas convencional e orgânica, respectivamente, foram registrados. Da mesma maneira, para couve-

manteiga, obteve-se $89,1 \pm 0,02\%$ de umidade na cultura hidropônica, $86,7 \pm 0,07\%$ na cultura convencional e $84,3 \pm 0,02\%$ na orgânica.

Tabela 2 - Teor de umidade de vegetais frescos da família Cruciferae obtidos sob diferentes tipos de cultura.

VEGETAL	TIPO DE CULTURA	TEOR DE UMIDADE (%)
Agrião (folhas e talos)	H	$86,5 \pm 0,01$
Brócolis (inflorescência)	C	$84,7 \pm 0,03$
	O	$82,9 \pm 0,01$
Couve-flor (inflorescências)	C	$89,7 \pm 0,13$
	O	$82,2 \pm 0,07$
Couve-manteiga (folhas)	C	$86,7 \pm 0,07$
	H	$89,1 \pm 0,02$
	O	$84,3 \pm 0,02$
Rabanete (raiz)	O	$94,0 \pm 0,17$
Repolho branco (folhas)	C	$91,0 \pm 0,13$
	O	$89,8 \pm 0,04$

Vegetais frescos de diferentes cultivos (C, convencional; O, orgânico; H, hidropônico) foram colhidos e processados em menos de oito horas e seu teor de umidade determinado após secagem em estufa, por 4 h a 50°C . Os valores representam a média \pm 1DP da percentagem de umidade obtida pela diferença entre o peso inicial do vegetal e seu peso após secagem ($n = 2$).

O elevado teor em água em vegetais da família Cruciferae é amplamente conhecido e os resultados obtidos com as espécies aqui avaliadas foram semelhantes aos documentados por outros autores (Herrmann, 1994; Singh *et al.*, 2001). O menor teor de umidade observado nos vegetais orgânicos, possivelmente resultante de um maior teor de matéria seca, ou seja, maior teor de nutrientes por peso de alimento, contribui de forma significativa na durabilidade destes, como também referido por alguns autores (Azevedo, 2003; Darolt, 2003).

Este fato está associado com a redução da atividade de água dos alimentos orgânicos, pois havendo menor umidade e menor teor de água livre, haverá menor grau de proliferação bacteriana e de deterioração precoce do alimento.

3.2 Avaliação da atividade antioxidante de crucíferas pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio

Embora pequenas diferenças para um mesmo vegetal foram encontradas conforme o tipo de cultivo, todos os vegetais incluídos neste trabalho mostraram teores de umidade muito próximos aos relatados por outros autores, não estando desta maneira deteriorados, e portanto aptos a serem investigados quanto ao seu potencial antioxidante. Dessa forma, procedeu-se primeiramente, ao ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio por ser este um método considerado simples, de baixo custo e usado quando se deseja avaliar e comparar a capacidade antioxidante de uma variedade de extratos (Prieto *et al.*, 1999). Assim, concentrações crescentes de extratos aquosos preparados de diferentes partes dos vegetais, obtidos de culturas convencional, hidropônica e orgânica foram submetidas à reação de óxido-redução como previamente descrito (Metodologia, item 2.6) (Figura 7).

A Figura 8 mostra os valores encontrados para a capacidade antioxidante desses extratos em relação à vitamina C (200 µg/ml), substância reconhecida pelo seu poder antioxidante (May, 1999; VanDuijn *et al.*, 2001, 2002) e freqüentemente utilizada como padrão neste tipo de ensaio experimental (Prieto *et al.*, 1999).

Nela, pode-se observar que todos os extratos avaliados apresentaram relevante atividade antioxidante, não só com relação à vitamina C, mas também com relação à rutina, um flavonóide abundante em frutas e vegetais, dotado de comprovada atividade antioxidante (Afanas'ev *et al.*, 1989; Ferrali *et al.*, 1997; Fiorani *et al.*, 2002). A solução teste inicial possui coloração amarela tomando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio reduz-se (Figura 7) (Prieto *et al.*, 1999)

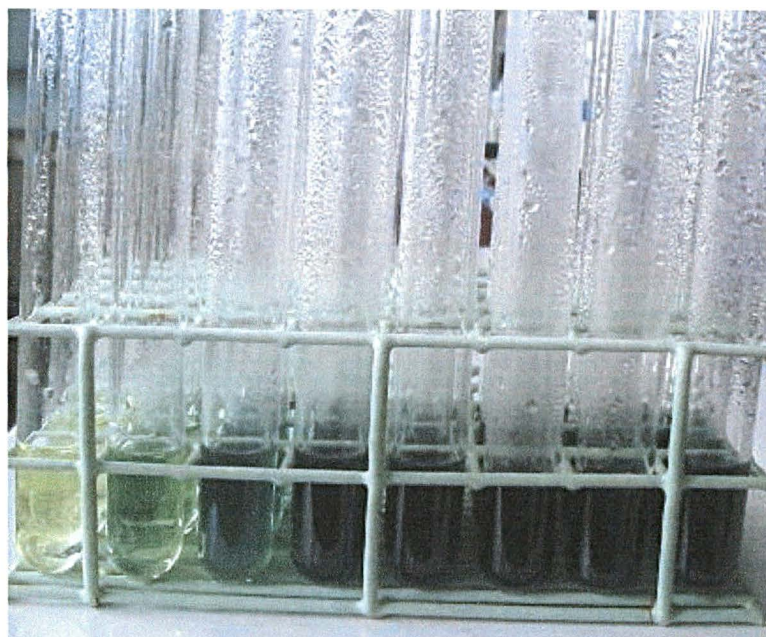


Figura 7. Colorações dos extratos após redução do complexo fosfomolibdênico. As colorações mais claras são resultantes de pouca transferência de elétrons, tornando-se mais escuras à medida que ocorre maior transferência de elétrons.

Dentre os extratos estudados, o que apresentou maior potencial para reduzir o complexo fosfomolibdênico foi o preparado com as inflorescências de brócolis proveniente de cultura orgânica, cuja atividade foi $7,13 \pm 0,24$ vezes superior à apresentada pela vitamina C, cuja atividade foi aqui considerada como 1,00. Em uma escala decrescente de valores para a atividade antioxidante, seguiu-se o repolho orgânico ($6,06 \pm 0,02$), a couve-manteiga orgânica ($5,49 \pm 0,07$), a couve-flor orgânica ($5,47 \pm 0,07$), os talos de couve-flor convencional ($5,36 \pm 0,10$), os talos e folhas de brócolis convencional ($5,3 \pm 0,08$), as inflorescências de couve-flor convencional ($5,16 \pm 0,07$), o rabanete orgânico ($4,94 \pm 0,13$), a couve-manteiga hidropônica ($4,51 \pm 0,17$), as inflorescências de brócolis convencional ($4,2 \pm 0,06$), couve-manteiga convencional ($3,87 \pm 0,05$) e,

por último, o extrato de agrião hidropônico, cuja atividade foi de $2,34 \pm 0,06$ maior do que a apresentada pela vitamina C em condições similares.

Esses resultados permitiram observar também que (1) há variação no potencial antioxidante entre as espécies de crucíferas analisadas; (2) que os métodos de cultivo exercem influência nessa atividade, exemplificada pelos extratos de couve-manteiga, onde um potencial antioxidante decrescente foi observado entre as culturas orgânicas ($5,49 \pm 0,07$), hidropônica ($4,51 \pm 0,17$) e convencional ($3,87 \pm 0,05$) ou pelos extratos de inflorescências de brócolis, com $4,2 \pm 0,06$ e $7,13 \pm 0,24$ observados para o cultivo convencional e orgânico, respectivamente; e que (3) a capacidade antioxidante varia de acordo com a parte do vegetal investigada, ilustrada pelas diferenças observadas quando testou-se extratos preparados de inflorescências ($4,2 \pm 0,06$) com aqueles preparados de talos e folhas ($5,3 \pm 0,08$) de brócolis, ambos oriundos de cultivo convencional.

Embora referências quanto ao potencial antioxidante de extratos de agrião e rabanete ainda não se encontrem disponíveis na literatura especializada, para as demais crucíferas avaliadas, como brócolis (Cao *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2002; Ninfali e Bacchiocca, 2003; Ou *et al.*, 2002), repolho (Cao *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2002; Ou *et al.*, 2002; Plumb *et al.*, 1997), couve-flor (Llorach *et al.*, 2003; Ou *et al.*, 2002) e couve-manteiga (Cao *et al.*, 1996), elas são abundantes e, de modo semelhante aos nossos resultados, revelam um potencial antioxidante desses vegetais, porém em níveis variáveis decorrentes, provavelmente, das diversas metodologias empregadas.

3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos de brócolis e couve-manteiga

Tendo o extrato aquoso de brócolis apresentado maior efeito antioxidante em relação aos demais, avaliados pelo método do complexo fosfomolibdênio, prosseguiu-se na investigação de sua capacidade antioxidante por outra metodologia química, usando-se, desta vez, a da redução do DPPH. Investigou-se, também, com mais detalhes a atividade antioxidante de couve-manteiga por ter sido o único vegetal, dentre os estudados, obtido sob três diferentes formas de cultivo. Para tanto, extratos etanólicos foram preparados e submetidos a CCD como ensaio preliminar, usando-se a rutina como substância de referência, cuja

capacidade de reduzir o DPPH em condições experimentais similares foi recentemente descrita (Bianco, 2003; Choi *et al.*, 2002).

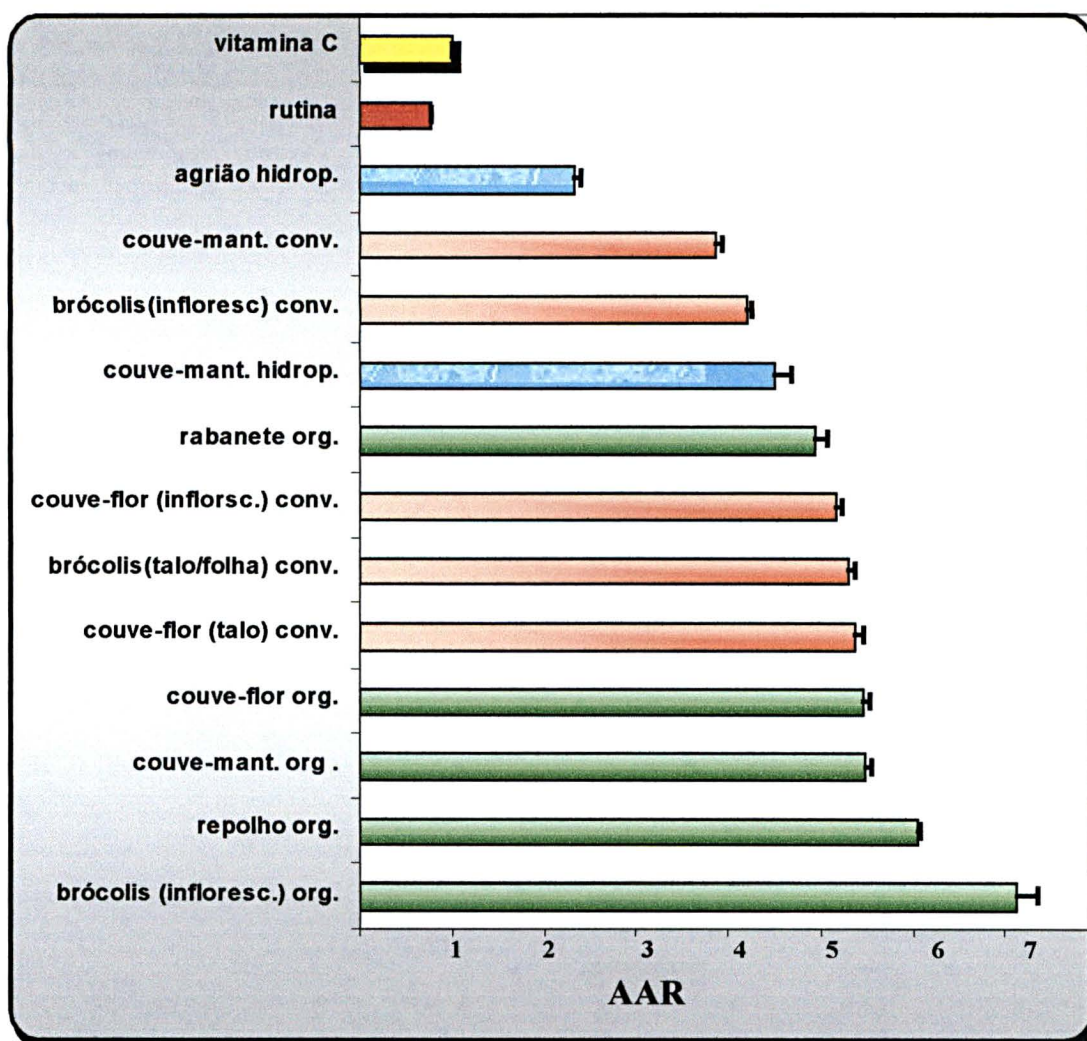


Figura 8. Comparação da atividade antioxidante de extratos vegetais da família Cruciferae obtidos de cultivo orgânico (org.), hidropônico (hidrop.) e convencional (conv.) Extratos aquosos (200µg/ml) preparados de diferentes partes crucíferas obtidos de cultivos ■ orgânico, ■ hidropônico e ■ convencional, foram preparados e seu potencial antioxidante investigado pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio. Cada coluna representa a média ± 1 desvio padrão da atividade antioxidante em relação a atividade desempenhada pela vitamina C (AAR), usada como padrão (200µg/ml) e rutina (200µg/ml) obtida de três ensaios independentes, realizados em triplicada.

A Figura 9 ilustra os resultados obtidos, onde o aparecimento de manchas amarelas, evidenciadas após revelação com solução de DPPH, contrastadas com a coloração violeta de fundo, indicou a presença de substâncias com potencial antioxidante (Choi *et al.*, 2002). Interessante notar que todas as manchas desenvolvidas pelos extratos foram semelhantes às apresentadas pelo padrão rutina, sugerindo sua presença nesses extratos. Com esses resultados investigou-se quantitativamente a capacidade desses extratos em reduzir o DPPH.

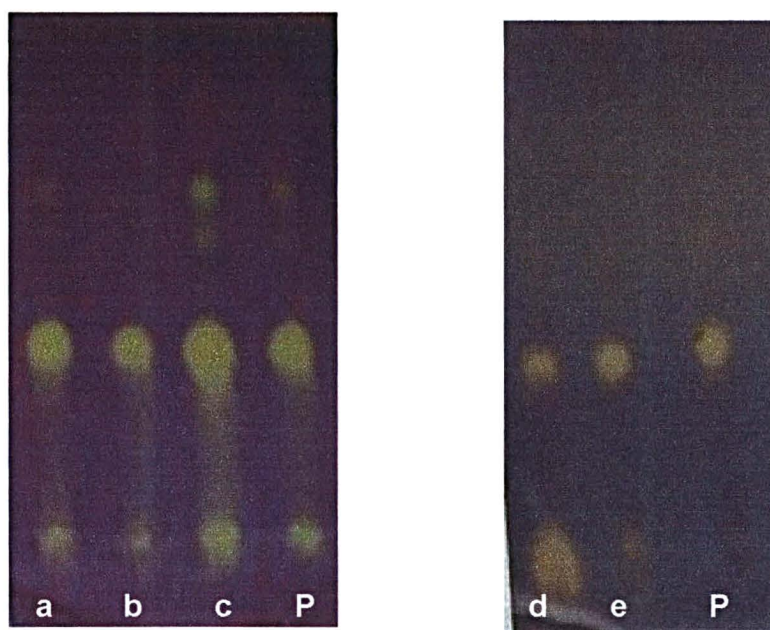


Figura 9. Cromatografia em camada delgada dos extratos de couve-manteiga e brócolis, revelados com solução de DPPH 0,2%. Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26). (a) extrato de couve-manteiga orgânica; (b) extrato de couve-manteiga hidropônica; (c) extrato de couve-manteiga convencional; (d) extrato de brócolis orgânico; (e) extrato de brócolis convencional; (P) rutina, usada como padrão na concentração de 1mg/ml.

3.4 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de brócolis e couve-manteiga pelo método de redução do DPPH

3.4.1. Adequação da metodologia: tempo de reação

O ensaio de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH^{*}) (Blois, 1958) tem sido amplamente utilizado como um método químico para a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, particularmente para extratos de plantas medicinais (Braca *et al.*, 2001; Braca *et al.*, 2002; Lu e Food, 2001; Mensor *et al.*, 2001) e vegetais comestíveis (Guo *et al.*, 2001; Llorach *et al.*, 2003; Sandoval *et al.*, 2002). Como anteriormente referido, neste ensaio, à medida que o DPPH^{*} sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração violeta intensa original da solução para amarela (Figura 10), cuja intensidade é proporcional à concentração da(s) substância(s) com potencial antioxidante presente(s), de conformidade com as leis de Lambert e Beer (Blois, 1958), e que pode ser medida espectrofotometricamente a 518 nm. Esta descoloração gradativa se deve ao pareamento, também gradativo, dos elétrons do DPPH^{*} disponíveis (Blois, 1958). Ou seja, quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução e maior a coloração amarela.

Entretanto, relatos têm alertado para o fato de que há substâncias antioxidantes que reagem de forma particular com o DPPH^{*}, implicando uma cinética diferenciada (Brand-Williams *et al.*, 1995). Por exemplo, a vitamina C, freqüentemente usada como padrão, assim como o ácido isoascórbico e o isogenol, reage com o DPPH^{*} em menos de um minuto, em contraste com o guaiacol, BHT ou o BHA, os quais podem levar algumas horas para reagir. Numa posição intermediária, com reações entre cinco e trinta minutos, estão compostos como o δ -tocoferol ou o ácido rosmarínico. Essas diferenças parecem ser decorrentes não só de um impedimento estérico (Hogg *et al.*, 1961; McGowan *et al.*, 1959; Pokorny, 1987), como também da presença e do número de hidroxilas existentes nessas moléculas (Brand-Williams *et al.*, 1995), as quais podem doar H⁺ para estabilizar o radical livre.

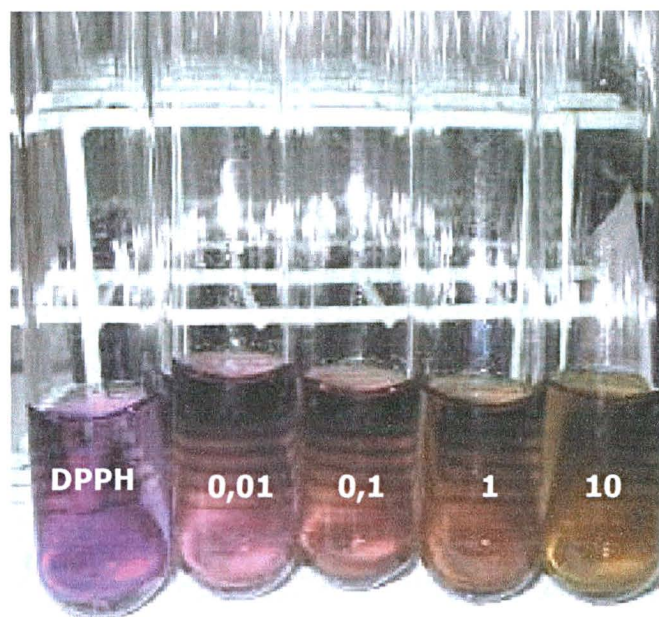


Figura 10. Atividade antioxidante de extrato de brócolis avaliada pelo método de redução do DPPH. Concentrações como indicado do extrato de brócolis foram tratadas com solução de DPPH por 30 min a temperatura ambiente e a mudança de coloração de violeta para amarela foi proporcional à concentração do extrato.

Neste contexto e devido ao fato de que, neste trabalho, usou-se extratos de diversos vegetais, os quais são constituídos por uma variedade indefinida de compostos com potencial antioxidante, tornou-se imprescindível estudar-se o comportamento nas condições experimentais em vários intervalos de tempo, com o objetivo de se avaliar uma cinética adequada de reação. Assim, concentrações crescentes do extrato etanólico de brócolis obtido de cultura orgânica (0,01 a 10 mg/ml) foram submetidas à reação com o DPPH^{*} (Metodologia, item 2.7). Em seguida, para cada concentração de extrato testada, uma cinética de reação foi graficamente construída e, desses gráficos, a percentagem de DPPH^{*} consumido foi determinada pelo decaimento da absorvância em 518 nm, medida nos tempos 0, 15, 30 e 60 min.

Como ilustrado na Figura 11, foi observado perfil semelhante, porém com variação na capacidade antioxidante nas diversas concentrações testadas em todos os tempos avaliados, com 7,8, 11,7, 13,1 e 13,0% de DPPH* consumido na concentração de 0,01 mg/ml; 17,1, 22,3, 24,0 e 22,0%, na concentração de 0,1 mg/ml; 50,6, 62,9, 71,0 e 69,1% na concentração de 1 mg/ml e 79,0, 87,1, 94,6 e 93,4%, na concentração de 10 mg/ml de extrato de brócolis para 0, 15, 30 e 60 min, respectivamente.

Entretanto, os valores obtidos nos tempos de 30 e 60 min foram muito próximos, inclusive com sobreposição das cinéticas, indicando que um aumento do tempo de reação além de 30 min não resultaria em aumento da redução deste radical.

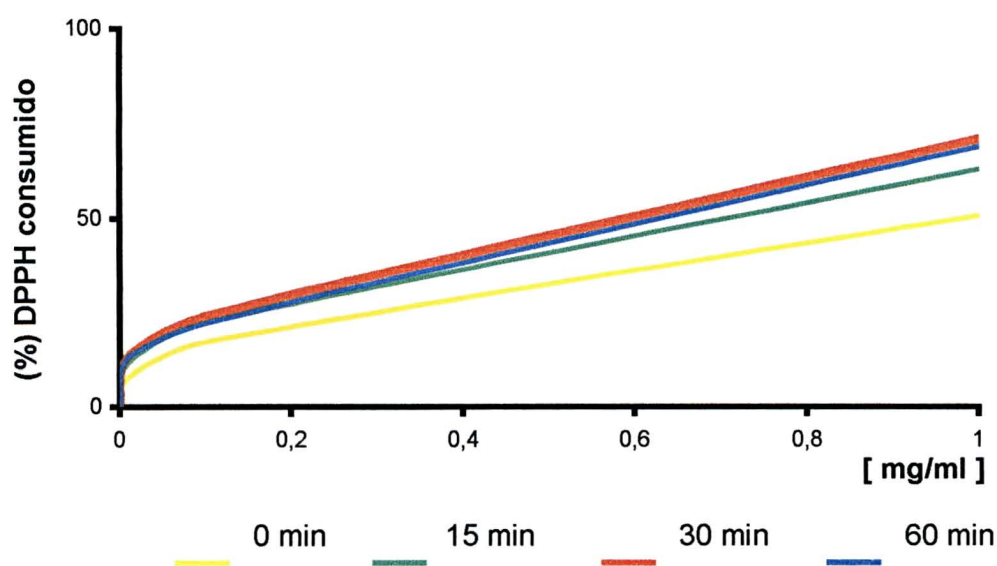


Figura 11. Influência do tempo de reação na redução do radical DPPH*. Concentrações crescentes (0,01 – 1 mg/ml) do extrato de brócolis foram preparadas em etanol e tratadas com solução de DPPH* a temperatura ambiente. Para cada concentração de extrato testada, uma cinética de reação foi graficamente construída, onde a porcentagem de DPPH* foi determinada pelo decaimento da absorvância em 518 nm, medida nos tempos 0, 15, 30 e 60 min. Cada ponto representa a porcentagem de radical livre consumido na concentração indicada, obtida de um experimento, realizado em triplicata.

Com esses resultados, definiu-se que o tempo de 30 min de reação seria, então, adequado para as análises pretendidas, corroborando com grande parte da literatura (Braca *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2001; Lu e Food, 2001), onde esse ensaio é empregado.

3.4.2. Adequação da metodologia: expressão dos resultados

Quando o método do DPPH é utilizado, variação acentuada no modo de apresentação dos resultados concernentes à atividade antioxidante investigada é observada, dificultando comparações. Por exemplo, pode-se expressar os resultados como a capacidade de seqüestrar/reduzir o radical DPPH* em percentagem (Choi *et al.*, 2002; Lu e Food, 2001), pelo valor de EC₅₀, ou seja, a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH* (Brand-Williams *et al.*, 1995; Sandoval *et al.*, 2002) ou, ainda, pelo poder antioxidante ou poder anti-radical, o qual expressa a relação inversa da EC₅₀ (Brand-Williams *et al.*, 1995; Sandoval *et al.*, 2002).

Neste trabalho, os resultados da capacidade antioxidante dos extratos de crucíferas estudados por esta metodologia estão apresentados sob duas formas: (a) pela EC₅₀ e (b) por meio da percentagem de redução da quantidade inicial de DPPH (% de DPPH consumido).

Para a determinação da EC₅₀, da mesma forma como realizado para o estabelecimento do tempo ideal de reação anteriormente discutido, concentrações crescentes (0,01 a 10 mg/ml) dos extratos etanólicos de couve-manteiga e brócolis, obtidos de cultura convencional, hidropônica e orgânica conforme indicado, foram submetidas à reação com o DPPH*. Em paralelo, a influência da presença de clorofila e substâncias lipofílicas no potencial antioxidante também foi investigada usando-se, para tanto, extratos preparados como descrito no item 2.4.3, da seção de Metodologia e nominados sem C/SL. Em seguida, para cada concentração testada, construiu-se a cinética de reação graficamente e, desses gráficos, a percentagem de DPPH* consumido foi determinada como previamente descrito. Entretanto, se faz necessário esclarecer que, no presente trabalho, da representação gráfica, obteve-se a equação, do tipo $y = ax + b$, a qual serviu como base para o cálculo da EC₅₀ por meio da equação de 1º grau:

Como exemplo desses procedimentos, a Figura 12 abaixo mostra os resultados obtidos com o extrato de brócolis orgânico com C/SL, destacando a equação da reta que, aplicada à equação, resultou nos valores de EC_{50} apresentados na Tabela 3. No exemplo acima, a equação da reta obtida foi:

$$y = 84,415x + 4,8447$$

\downarrow \downarrow
a **b**

Considerando-se o valor de “y” = 50, tem-se:

$$50 = 84,415x + 4,8447$$

$$EC_{50} = x = 0,53$$

Tabela 3 – Capacidade antioxidante dos extratos de couve-manteiga e brócolis (mg/ml), obtidos de diferentes cultivos, na presença ou não de clorofila e substâncias lipofílicas (C/SL), avaliada pelo método do DPPH, usando-se a vitamina C como padrão de referência.

Couve-manteiga orgânica			
extrato [mg/ml]	DPPH consumido (%)	Equação da reta R ²	EC ₅₀ (mg/ml)
0,01	5,1 ± 0,6	y = 77,091x + 3,2023 R ² = 0,996	0,60
0,1	13,2 ± 1,9		
1	80,1 ± 1,7		
10	95,2 ± 2,0		
Couve-manteiga orgânica sem C/SL*			
0,01	6,2 ± 1,5	y = 85,141x + 4,2133 R ² = 0,994	0,53
0,1	16,2 ± 1,6		
1	89,0 ± 2,6		
10	93,7 ± 0,3		
Couve-manteiga hidropônica			
0,01	11,8 ± 2,2	y = 72,556x + 5,4994 R ² = 0,982	0,61
0,1	31,1 ± 0,6		
1	79,0 ± 2,8		
10	96,9 ± 2,9		
Couve-manteiga hidropônica sem C/SL			
0,01	22,7 ± 1,3	y = 69,005x + 18,513 R ² = 0,939	0,45
0,1	42,3 ± 1,2		
1	85,8 ± 0,3		
10	96,7 ± 1,9		
Couve-manteiga convencional			
0,01	14 ± 0,7	y = 59,689x + 9,9313 R ² = 0,938	0,67
0,1	23,2 ± 1,9		
1	68,9 ± 0,7		
10	94,9 ± 2,0		
Couve-manteiga convencional sem C/SL			
0,01	7,7 ± 0,2	y = 82,345x + 7,2619 R ² = 0,991	0,52
0,1	24 ± 0,6		
1	88,8 ± 0,5		
10	93,4 ± 0,2		

Brócolis orgânico			
0,01	6,5 ± 0,2	$y = 84,415x + 4,8447$ $R^2 = 0,991$	0,53
0,1	17,8 ± 0,4		
1	88,8 ± 0,2		
10	95,8 ± 1,9		
Brócolis orgânico sem C/SL			
0,01	7,8 ± 0,4	$y = 86,487x + 7,2548$ $R^2 = 0,976$	0,49
0,1	24,4 ± 0,7		
1	92,9 ± 1,1		
10	96,7 ± 0,2		
Brócolis convencional			
0,01	1,7 ± 0,5	$y = 80,682x - 0,0743$ $R^2 = 0,999$	0,62
0,1	6,9 ± 0,2		
1	80,7 ± 0,9		
10	91,0 ± 0,8		
Brócolis convencional sem C/SL			
0,01	10,0 ± 0,6	$y = 81,993x + 6,1968$ $R^2 = 0,987$	0,63
0,1	18,0 ± 0,1		
1	87,8 ± 0,6		
10	96,1 ± 0,1		
Vitamina C			
[x10 ⁻³ mg/ml]	DPPH consumido (%)	Equação da reta R^2	EC ₅₀ [x10 ⁻³ mg/ml]
5	8,0 ± 0,6	$y = -0,0074x^2 + 1,7542x - 0,1479$ $R^2 = 0,9999$	0,033
10	17,0 ± 0,7		
25	39,0 ± 0,6		
50	69,0 ± 0,4		

[*] extratos vegetais sem clorofila e substâncias lipofílicas.

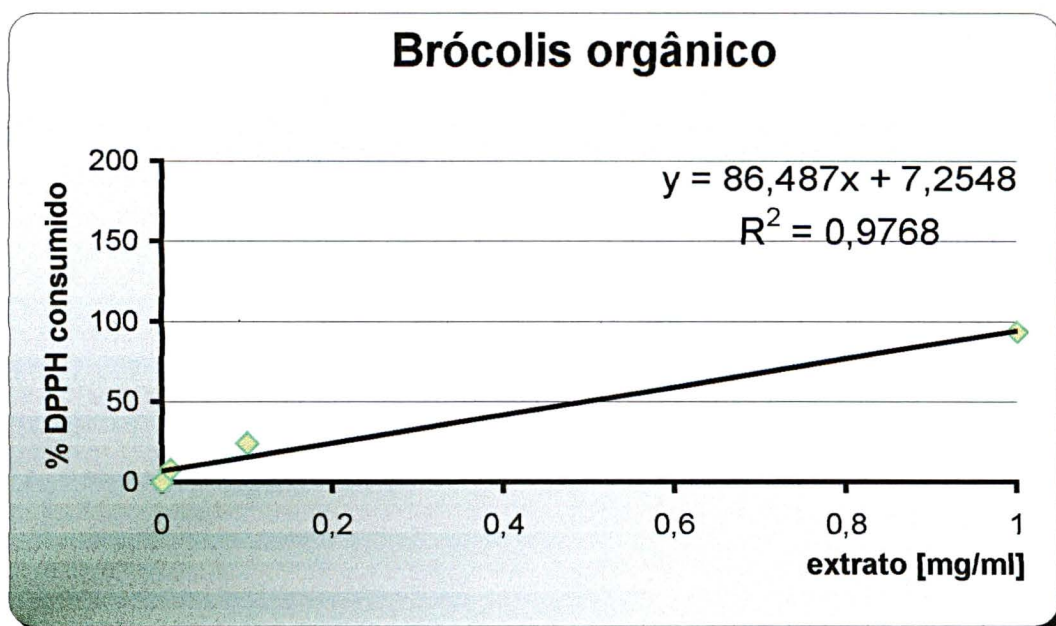


Figura 12. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de brócolis pelo teste de redução do radical DPPH^{*}. Concentrações crescentes (0,01 – 1 mg/ml) do extrato de brócolis foram tratadas com solução de DPPH^{*} por 30 min a temperatura ambiente. Para cada concentração testada, uma cinética de reação foi graficamente construída, onde a percentagem de DPPH^{*} foi determinada pelo decaimento da absorvância em 518 nm. Cada ponto representa a percentagem média de radical livre consumido na concentração indicada, obtida de três experimentos independentes, realizados em triplicata, dos quais obteve-se a equação da reta.

A EC₅₀ foi variável e, seguindo uma escala crescente, o maior potencial antioxidante demonstrado foi pelo extrato de couve-manteiga hidropônica sem C/SL (EC₅₀ = 0,45 mg/ml), seguido do extrato de brócolis orgânico sem C/SL (EC₅₀ = 0,49 mg/ml), couve-manteiga convencional sem C/SL (EC₅₀ = 0,52 mg/ml), couve-manteiga orgânica sem C/SL (EC₅₀ = 0,53 mg/ml), brócolis orgânico (EC₅₀ = 0,53 mg/ml), couve-manteiga orgânica (EC₅₀ = 0,60 mg/ml), couve-manteiga hidropônica (EC₅₀ = 0,61 mg/ml), brócolis convencional (EC₅₀ = 0,62 mg/ml), brócolis convencional sem C/SL (EC₅₀ = 0,63 mg/ml) e, por último, o de couve-manteiga convencional (EC₅₀ = 0,67 mg/ml).

Para a couve-manteiga, quando os tipos de cultura foram analisados, destacou-se a capacidade antioxidante demonstrada pelo extrato preparado de cultivo orgânico, superior às demonstradas pelas culturas hidropônica e convencional. Já para o brócolis, não disponível em cultura hidropônica, o cultivo orgânico apresentou-se com capacidade antioxidante superior à demonstrada pelo extrato convencional.

Embora o extrato de couve-manteiga hidropônica tenha demonstrado capacidade antioxidante superior ao do extrato obtido de cultivo convencional, deve-se interpretar esses resultados com cautela, pois como revisto na introdução deste trabalho, alimentos hidropônicos apresentam-se comumente com elevado teor de nitratos, cujos derivados parecem contribuir na patogênese de algumas doenças como, por exemplo, o câncer (Leitão, 2003; Rodet, 2003).

Estudos semelhantes realizados com outros vegetais da família Cruciferae, como maca (*Lepidium meyenii*, EC_{50} = 0,6 mg/ml), nativa do Peru (Sandoval *et al.*, 2002), mostarda (*Sinapis alba*, EC_{50} = 245 mg/ml), canola (*Brassica napus*, EC_{50} = 187,6 mg/ml) e outras variedades de *Brassica* sp. (Matthaus, 2002) também demonstraram relevante atividade antioxidante, porém com valores de EC_{50} muito superiores aos aqui relatados. É possível que isso se deva não só à diferenças entre as espécies estudadas, como também às inúmeras variáveis ambientais, além dos métodos utilizados para o preparo dos extratos. Ao se comparar estes resultados com a ação exercida por extratos de plantas medicinais foi possível verificar que estas apresentam maior capacidade antioxidante (Hu *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2001). No entanto, é importante destacar que plantas medicinais não são consumidas usualmente como parte integrante de uma dieta, e que, portanto, o efeito antioxidante exercido por extratos vegetais são de inestimável importância, contribuindo de forma significativa na proteção e manutenção da saúde do homem.

Entretanto, outro fator que poderia contribuir para a marcante diferença dos resultados é o modo de como o valor de EC_{50} foi determinado. Frequentemente, a EC_{50} é um valor obtido pela interpolação da concentração da substância analisada (eixo das abscissas – “x”) com a % de DPPH* consumido (eixo das ordenadas – “y”) (Brand-Williams *et al.*, 1995), como ilustrado na Figura 13, para o mesmo extrato de brócolis orgânico demonstrado na Figura 12.

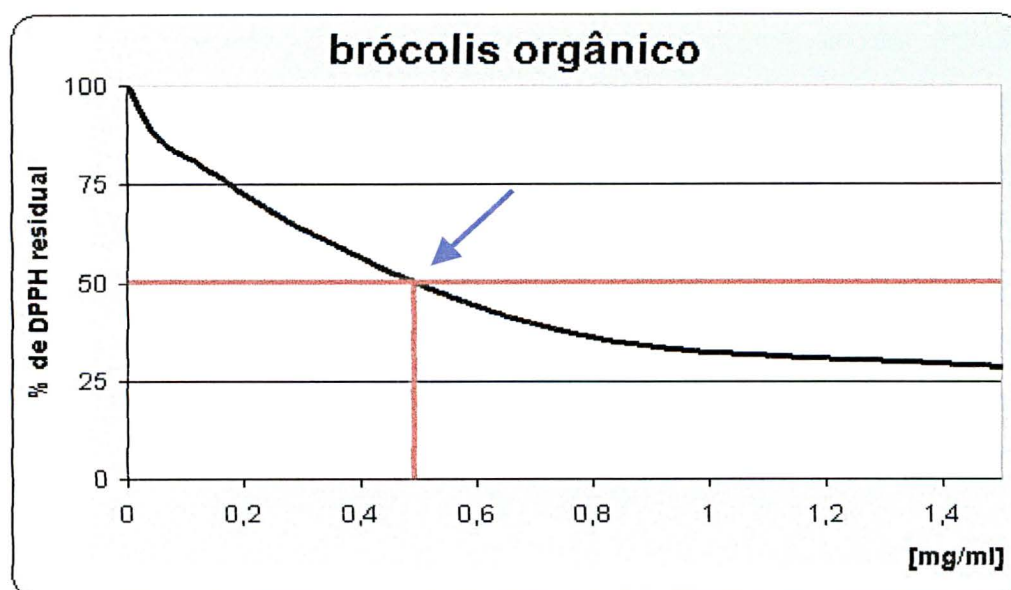


Figura 13. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de brócolis pelo teste de redução do radical DPPH^{*}. Concentrações crescentes (0,01 – 1 mg/ml) do extrato de brócolis foram tratadas com solução de DPPH^{*} por 30 min a temperatura ambiente. Para cada concentração de extrato testada, uma cinética de reação foi graficamente construída, onde a percentagem de DPPH^{*} foi determinada pelo decaimento da absorvância em 518 nm. Cada ponto representa a percentagem média de DPPH^{*} residual na concentração indicada, obtida de três experimentos independentes, realizados em triplicata. A EC₅₀ de aproximadamente 0,3 mg/ml (seta) representa a quantidade de extrato de brócolis orgânico, em mg/ml, necessário para reduzir a concentração inicial de DPPH^{*} em 50%.

A EC₅₀ de 0,53 mg/ml encontrada após interpolação dos eixos constitui-se em um valor muito próximo ao encontrado quando se usa a equação da reta em associação com a equação do 1º grau. Entretanto, ao se usar a expressão matemática, o resultado torna-se preciso em relação àquele obtido com a interpolação, o qual é um “valor estimado”. Essas considerações podem não ser relevantes quando se compara a capacidade antioxidante de extratos com capacidades muito distintas, como por exemplo, as demonstradas pelos extratos de brócolis convencional e orgânico (EC₅₀ de 0,62 e 0,53 mg/ml, respectivamente). Porém, quando se pretende comparar substâncias com capacidade antioxidante muito próximas, como é o caso dos obtidos com o brócolis orgânico com e sem clorofila (EC₅₀ de 0,53 e 0,49 mg/ml, respectivamente), ele permite distinguir mais precisamente o efeito. Sua aplicação

pode ter grande relevância quando se pretende avaliar, por exemplo, a atividade antioxidante ou qualquer outro tipo de ação exercida por substâncias puras em sistemas biológicos, como em cultura de células, onde o efeito de quantidades extremamente pequenas pode e/ou deve ser monitorado rigorosamente.

Por outro lado, quando a capacidade antioxidante desses extratos em reduzir o DPPH[•] é expressa em função da quantidade de radical livre consumido, conforme demonstrado na Figura 14, pode-se observar que (1) o efeito antioxidante é dose-dependente; (2) que, à exceção do extrato de couve-manteiga convencional na concentração de 1 mg/ml, todos os extratos testados nessa concentração foram capazes de reduzir em mais de 80% a quantidade de DPPH[•] e que (3) todos os extratos, na concentração de 10 mg/ml, demonstraram capacidade superior a 90% em reduzir o DPPH[•], semelhante ao demonstrado recentemente pelo extrato metanólico de brócolis (Guo *et al.*, 2001).

Relevante se faz, neste momento, comentar o modo como o efeito antioxidante de vários extratos de crucíferas usando-se o sistema do DPPH foi apresentado neste trabalho. Expressos sob duas formas freqüentemente encontradas na literatura, ambas retrataram a mesma ação, mas de forma complementar, possibilitando observar, comparativamente, diferenças entre extratos de um mesmo vegetal, a influência do tipo de cultivo ou da presença/ausência de substâncias nesta atividade.

Neste último aspecto, um dos fatores interessantes desta série de experimentos foi com relação à significativa atividade antioxidante demonstrada pelos extratos de crucíferas após a retirada de clorofila e substâncias lipofílicas (C/SL) quando comparada à demonstrada pelos extratos etanólicos originais. Por exemplo, enquanto o extrato de brócolis orgânico demonstrou uma EC₅₀ de 0,34 mg/ml, o mesmo extrato, após tratamento, apresentou uma EC₅₀ de 0,23 mg/ml. Já para a couve-manteiga orgânica, observou-se uma EC₅₀ de 0,48 mg/ml contra uma EC₅₀ de 0,38 mg/ml, para os extratos com e sem C/SL, respectivamente. Esses resultados estão em contraste com dados recentemente publicados para extratos de plantas medicinais, onde extratos de carqueja (*Baccharis*) após a remoção da C/SL reduziram menos de 10% o radical DPPH (Boas *et al.*, 2003) ou para extratos de brócolis, usando outros métodos químicos de avaliação da capacidade antioxidante (ORAC) (Kurilich *et al.*, 2002).

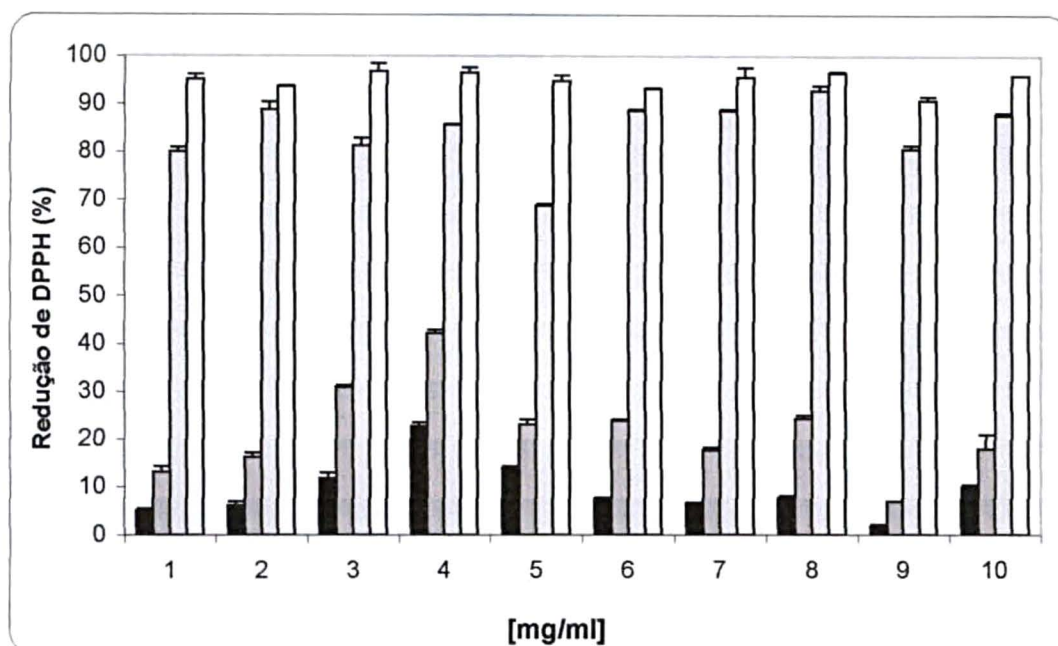


Figura 14. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de crucíferas pelo teste de redução do radical DPPH^{*}. Concentrações crescentes (0,01 – 10 mg/ml) dos extratos indicados foram tratadas com solução de DPPH^{*} por 30 min a temperatura ambiente. Cada coluna representa a percentagem média \pm 1DP de DPPH^{*} consumido, obtida de três experimentos independentes, realizados em triplicata, onde ■ 0,01 mg/ml ■ 0,1 mg/ml ■ 1 mg/ml e □ 10 mg/ml.

Os números representam os extratos etanólicos dos vegetais:

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1- couve-manteiga orgânica | 2- couve-manteiga orgânica sem C/SL |
| 3- couve-manteiga hidropônica | 4- couve-manteiga hidropônica sem C/SL |
| 5- couve-manteiga convencional | 6- couve-manteiga convencional sem C/SL |
| 7- brócolis orgânico | 8- brócolis orgânico sem C/SL |
| 9- brócolis convencional | 10- brócolis convencional sem C/SL |

Apesar de que estudos mais direcionados sejam necessários, é provável que o processo de remoção desses compostos tenha, indiretamente, extraído substâncias que poderiam, eventualmente, não estar contribuindo para com a capacidade antioxidante dos extratos. Ou seja, com a sua remoção, é possível que uma maior concentração de substâncias com potencial antioxidante tenha ocorrido, resultando no aumento na capacidade antioxidante observada nos extratos sem C/SL e que, portanto, a clorofila e substâncias lipofílicas não sejam as responsáveis pela ação antioxidante desses extratos.

3.5 Doseamento de flavonóides

Com o objetivo de tentar esclarecer se essas diferenças poderiam ser decorrentes dos processos de cultivo e devido ao fato de que vegetais da família Cruciferae possuem reconhecidamente alto teor em flavonóides, substâncias com elevado potencial antioxidante (Hertog *et al.*, 1992; Justesen *et al.*, 1998; Kurilich *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 1997; Ninfali e Bacchiocca, 2003; Plumb *et al.*, 1997), investigou-se sua presença usando-se metodologia tradicional (item 2.9.1, Metodologia), a qual foi fortemente positiva em todos os extratos e em ambas frações, visualizada pela formação de coloração vermelha no tubo reator. Em seguida, quantificou-se esses flavonóides pela metodologia descrita na Farmacopéia Helvética (1995), cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Doseamento de flavonóides totais em extrato de vegetais da família Cruciferae.

VEGETAL	FLAVONÓIDES TOTAIS (g%)	
	extrato etanólico	extrato etanólico sem C/SL
Couve-manteiga orgânica	0,217 ± 0,018	0,167 ± 0,020
Couve-manteiga hidropônica	0,198 ± 0,014	0,181 ± 0,010
Couve-manteiga convencional	0,199 ± 0,009	0,169 ± 0,013
Brócolis orgânico	0,174 ± 0,006	0,161 ± 0,018
Brócolis convencional	0,233 ± 0,001	0,196 ± 0,036

Frações liofilizadas de extratos das crucíferas indicadas foram suspensas em água e a retirada da clorofila e de substâncias lipofílicas deu-se após 8 h de agitação mecânica contínua em banho de gelo seguida de repouso refrigerado por 12 h. Os flavonóides totais foram, então, doseados em ambas frações conforme metodologia preconizada pela Farmacopéia Helvética (1995). Cada valor representa a quantidade média ± 1DP de flavonóides totais em g%, de três experimentos. C/SL: extrato após a retirada de clorofila e substâncias lipofílicas.

Para todos os extratos de couve-manteiga, os valores encontrados foram muito próximos, independente do processo de cultivo ou da presença de clorofila e substâncias lipofílicas. Entretanto, para os extratos de brócolis, a quantidade de flavonóides no cultivo convencional ($0,233 \pm 0,001$) foi significativamente superior ($n = 3$; $p < 0,01$) àquela encontrada no cultivo orgânico ($0,174 \pm 0,006$), porém somente nos extratos que não sofreram tratamento para a retirada de clorofila e substâncias lipofílicas.

Esses resultados sugerem que a variação observada na atividade antioxidante dos extratos investigados possivelmente não esteja associada apenas ao teor de flavonóides e que a capacidade antioxidante observada em nossos experimentos possa estar também associada a substâncias outras, atuando sinergicamente na redução de radicais livres, como sugerido por outros (Kurilich *et al.*, 2002).

Mesmo sabendo-se que vegetais da família Cruciferae são fontes ricas de antioxidantes, confirmado inclusive pelos resultados experimentais até aqui apresentados, nenhuma delas demonstrou capacidade antioxidante similar ou mesmo próxima à atividade da vitamina C, cuja EC_{50} foi extremamente baixa, ou seja, $33 \mu\text{g/ml}$. Isto poderia ser decorrente do fato de que a vitamina C, utilizada como padrão de referência de nosso procedimento experimental, é uma substância pura, em contraste com os extratos vegetais investigados, os quais possuem diferentes compostos, muitos dos quais com capacidade para influenciar o potencial antioxidante como acima mencionado. Neste contexto, interessante seria poder isolar todos os componentes desses extratos e, após conhecer-se a atividade antioxidante de cada um, determinar a capacidade antioxidante do extrato.

3.6 Ensaio de inibição da formação de metahemoglobina induzida por fenilhidrazina em eritrócitos humanos

Um dos objetivos do presente trabalho foi, em paralelo aos ensaios químicos, o de desenvolver um ensaio biológico para a avaliação da atividade antioxidante de extratos de vegetais usando eritrócitos humanos, os quais são dotados de um sistema natural capaz de protegê-los contra a oxidação de seus

constituintes, de forma a garantir sua integridade estrutural e funcional, além de assegurar que o ferro da molécula de hemoglobina permaneça na forma ferrosa (Fe^{+2}). No entanto, se o eritrócito for exposto a uma sobrecarga oxidativa que supere sua capacidade redutora, poderá haver um aumento proporcional na produção de metaHb, uma proteína incapaz de carrear o oxigênio por apresentar o ferro no estado oxidado (Fe^{+3}), a qual pode ser avaliada quantitativamente após leitura em 630 nm.

Assim, alíquotas de suspensão de eritrócitos obtidos de doadores voluntários (item 2.8.1, Metodologia), pré-tratadas ou não com vitamina C (20 mM) ou concentrações crescentes (0,01 a 100 mg/ml) dos extratos etanólicos, com e sem C/SL, de brócolis e couve-manteiga, foram submetidas ao estresse oxidativo induzido por Fh (1 mM) como descrito no item 2.8.2, da seção de Metodologia. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15 a 20, onde cada coluna representa, na concentração indicada, a porcentagem de metaHb formada em relação à amostra controle, tratada apenas com Fh e normalizada em 100%.

A exposição de eritrócitos humanos pré-tratados com vitamina C e Fh (Figura 15) resultou na redução significativa de $48,0 \pm 4,7\%$ de metaHb formada ($n=20$; $p < 0,005$), confirmando resultados recentemente demonstrados por outros (Claro, 2002), indicando uma proteção eficiente dessa substância sobre os eritrócitos no modelo proposto, corroborando com sua reconhecida ação antioxidante (Carr e Frei, 1999; Leonard *et al.*, 2002; Toit *et al.*, 2001).

Ao investigar-se os efeitos protetores do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo orgânico sob condições experimentais similares (Figura 16), as concentrações de 0,01 a 100 mg/ml foram capazes de reduzir significativamente a formação de metaHb ($n = 3$; $p \leq 0,005$) em comparação à amostra controle, produzindo $58,5 \pm 1,0\%$, $44,4 \pm 1,7\%$, $29,5 \pm 0,1\%$, $14,5 \pm 1,3\%$ e $91,0 \pm 0,6\%$ de metaHb, respectivamente.

Quando semelhante experimento foi realizado com o extrato de couve-manteiga orgânica onde a clorofila e as substâncias lipofílicas foram extraídas (extrato sem C/SL), padrão similar de efeito protetor foi observado, com formação de $69,3 \pm 0,7\%$, $54,0 \pm 0,7\%$, $19,9 \pm 0,9\%$, $13,5 \pm 0,3\%$ e $93,3 \pm 0,3\%$ de metaHb para as concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 mg/ml, respectivamente, todas significativamente inferiores à amostra controle ($n = 3$; $p \leq 0,005$).

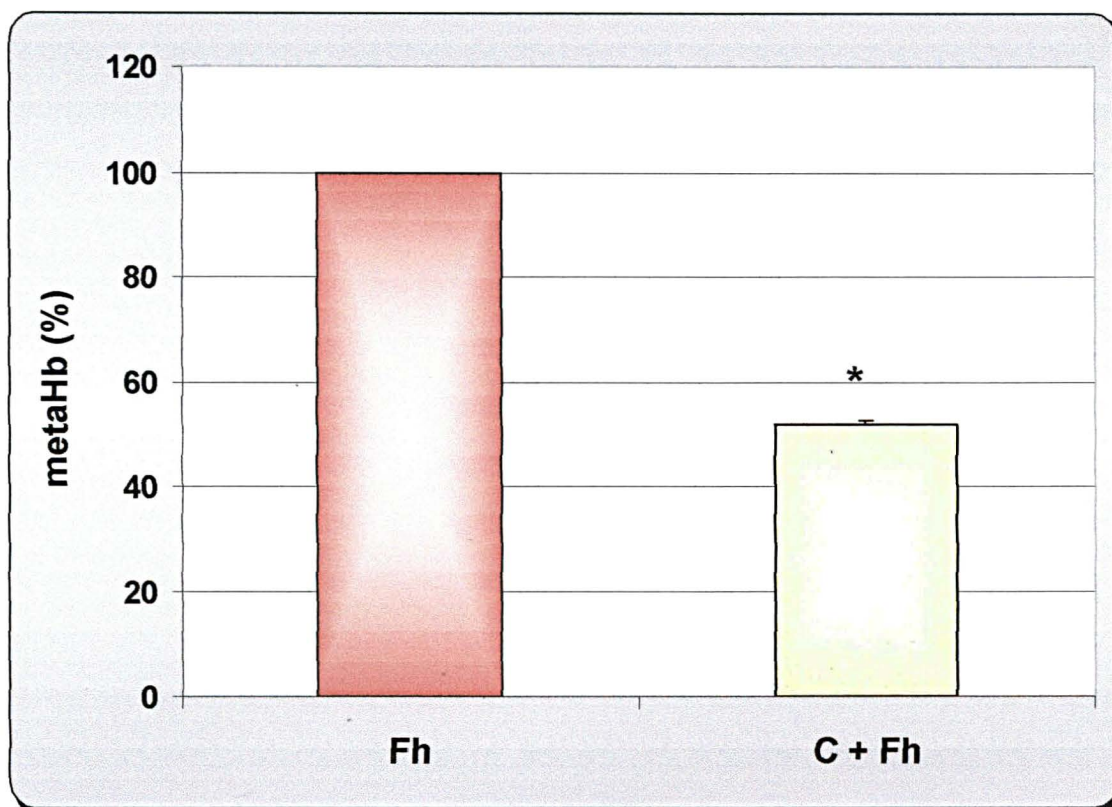


Figura 15. Efeito da fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos. Suspensão de eritrócitos humanos, pré-tratados ou não com vitamina C (C, 20mM), foram incubadas com cloridrato de fenil-hidrazina (Fh, 1 mM) por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua e a formação de metahemoglobina obtida pela absorvância em 630nm, como descrito no item 2.8.4 da seção de Metodologia. Cada coluna representa a média da porcentagem de formação de metahemoglobina \pm 1DP, normalizada em 100%, de vinte experimentos independentes, realizados em triplicata (* $p \leq 0,005$, teste t de Student).

Esses resultados demonstraram que o melhor efeito antioxidante exercido por esses extratos no sistema proposto foi na concentração de 10 mg/ml, independente da presença de clorofila e substâncias lipofílicas ($n = 3$; $p > 0,005$) e que sua capacidade protetora foi semelhante à apresentada pela vitamina C ($52,7 \pm 1,6\%$) nas concentrações de 0,01 para ambos extratos. Contudo, efeito significativamente superior ao da vitamina C foi observado nas concentrações de 0,1 mg/ml para o extrato com C/SL e nas concentrações de 1 e 10 mg/ml para os extratos com e sem C/SL ($n = 3$; $p \leq 0,005$ para ambos).

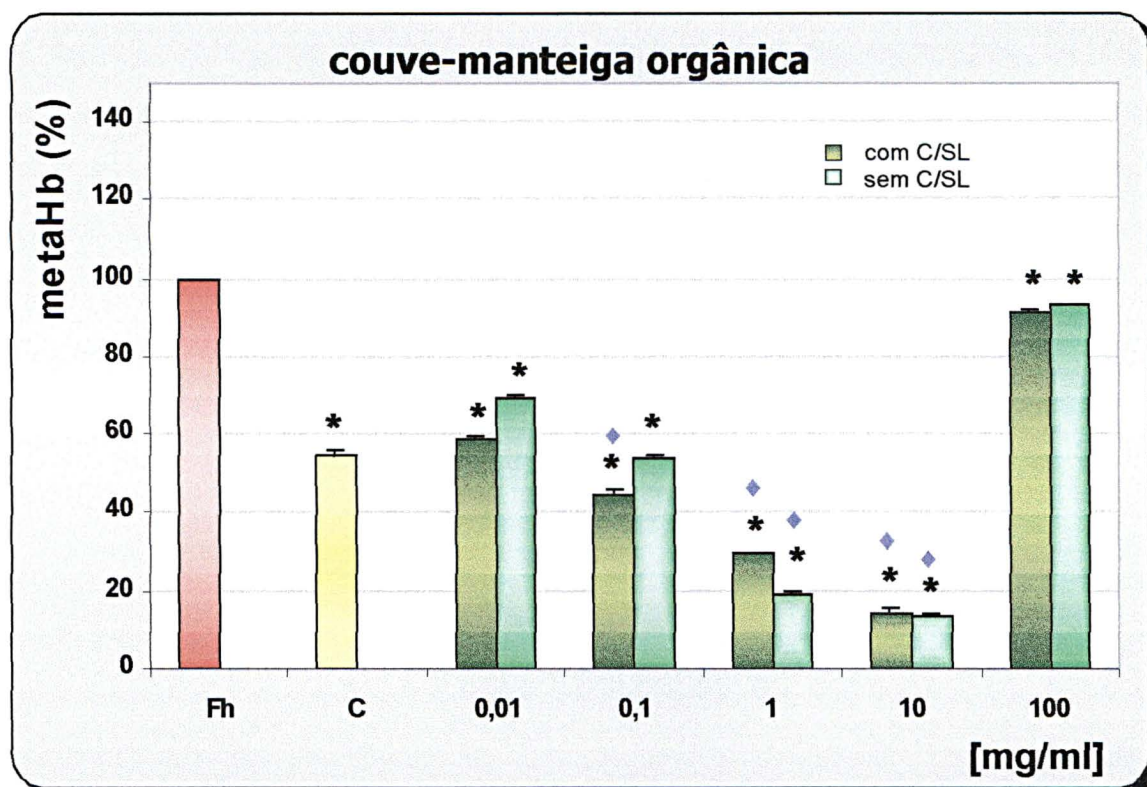


Figura 16. Efeito do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo orgânico sobre a formação de metahemoglobina (metaHb) induzida por fenil-hidrazina (Fh) sobre eritrócitos humanos. Suspensão de eritrócitos humanos, pré-tratados ou não com vitamina C (C, 20mM) ou concentrações como indicado do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo orgânico, com e sem clorofila e substâncias lipofílicas , foram incubadas com Fh (1 mM) por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua e a formação de metaHb obtida pela absorvância em 630nm, como descrito no item 2.8.4 da seção de Metodologia. Cada coluna representa a média da porcentagem de formação de metaHb \pm 1DP, normalizada em 100%, de três experimentos independentes, realizados em triplicata (* $p \leq 0,005$ em relação à Fh; ♦ $p \leq 0,005$ em relação à vitamina C; teste *t* de Student).

Ao investigar-se os extratos de couve-manteiga hidropônica com e sem C/SL (Figura 17), verificou-se que, nas concentrações de 0,01 a 10 mg/ml, os extratos mostraram-se significativamente superior em relação ao efeito protetor sobre os eritrócitos submetidos à ação oxidante da Fh, com formação de $81,8 \pm 0,5\%$, $63,8 \pm 3,7\%$, $53,3 \pm 2,6\%$ e $19,0 \pm 0,4\%$ e de $64,3 \pm 2,4\%$, $50,1 \pm 3,1\%$, $20,5$

$\pm 1,4\%$ e $45,4 \pm 3,0\%$ de metaHb, respectivamente ($n = 3$; $p \leq 0,005$). Os extratos sem C/SL, nas concentrações de 0,1 a 10 mg/ml, apresentaram capacidade antioxidante significativamente superior à da vitamina C ($n = 3$; $p \leq 0,005$). Efeito similar a este foi observado apenas nas concentrações de 1 e 10 mg/ml, quando o extrato apresentava C/SL.

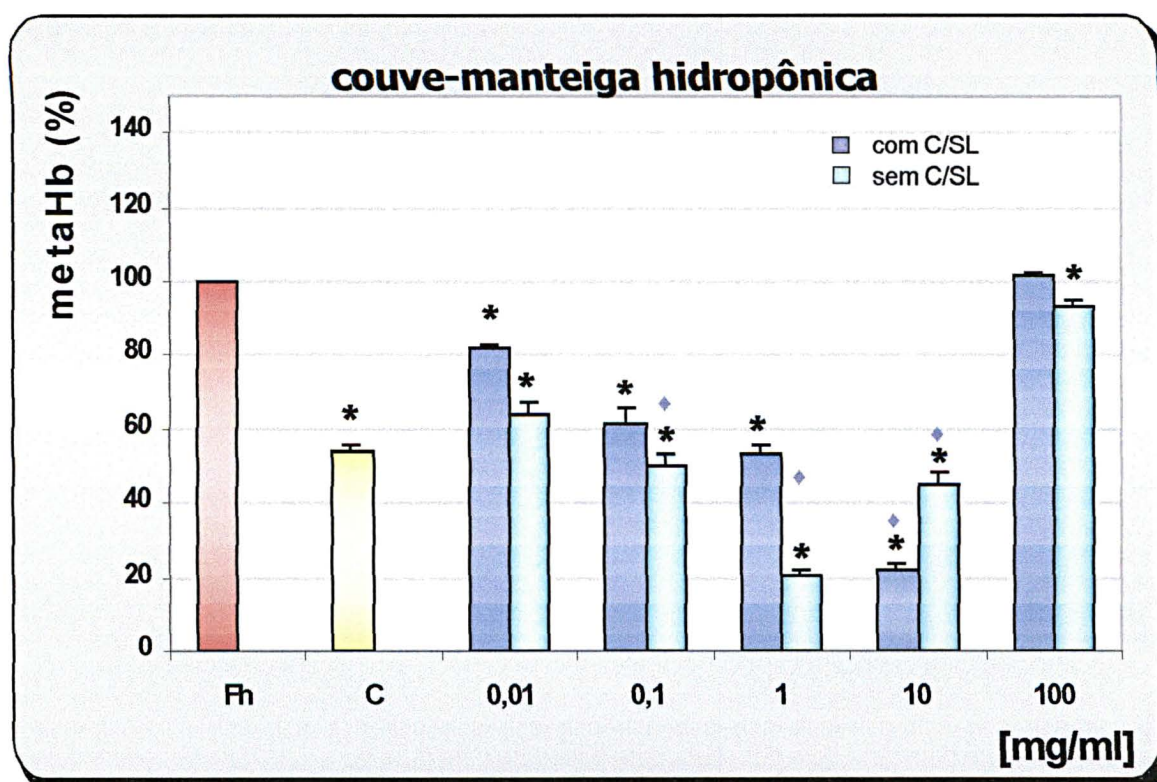


Figura 17. Efeito do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo hidropônico sobre a formação de metahemoglobina (metaHB) induzida por fenil-hidrazina (Fh) sobre eritrócitos humanos. Suspensão de eritrócitos humanos, pré-tratados ou não com vitamina C (C, 20mM) ou concentrações como indicado do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo hidropônico, com ■ e sem clorofila e substâncias lipofílicas ■, foram incubadas com Fh (1 mM) por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua e a formação de metaHb obtida pela absorvância em 630 nm, como descrito no item 2.8.4 da seção de Metodologia. Cada coluna representa a média da porcentagem de formação de metaHb $\pm 1DP$, normalizada em 100%, de três experimentos independentes, realizados em triplicata (* $p \leq 0,005$ em relação à Fh; ♦ $p \leq 0,005$ em relação à vitamina C; teste *t* de Student).

Nesta série de experimentos, embora o melhor efeito antioxidante observado tenha sido significativamente semelhante para ambos extratos, quando comparados ao controle, sua concentração foi diferente, sendo de 10 mg/ml para o extrato com C/SL e de 1 mg/ml para o extrato sem C/SL. Ou seja, os resultados indicam que é necessário dez vezes mais extrato de couve-manteiga hidropônica com C/SL para que o mesmo efeito antioxidante produzido pelo extrato de couve-manteiga hidropônica sem C/SL seja observado.

Com relação à couve-manteiga convencional (Figura 18), ação antioxidante significativa foi observada nas concentrações de 0,01 a 1 mg/ml, com a produção de $92,3 \pm 0,6\%$, $85,1 \pm 1,6\%$ e $45,7 \pm 0,7\%$ de metaHb, respectivamente ($n = 3$; $p \leq 0,005$). E, em contraste com os extratos anteriores, nas concentrações de 10 e 100 mg/ml observou-se uma diminuição da proteção exercida pelos extratos sobre o sistema, com formação de metaHb semelhante ao produzido pela Fh, ou seja, $104,4 \pm 1,9\%$ e $152,9 \pm 2,0\%$ de metaHb, respectivamente ($n=3$; $p < 0,005$).

Ao investigar-se os efeitos antioxidantes quando se retirou a clorofila e as substância lipofílicas, esses foram significativos nas concentrações de 0,01 a 10 mg/ml, com a formação de $62,5 \pm 2,7\%$, $16,6 \pm 1,2\%$, $29,1 \pm 1,8\%$ e $66,5 \pm 2,2\%$ de metaHb, respectivamente ($n=3$; $p < 0,005$). Esse mesmo extrato, na concentração de 100 mg/ml, também se apresentou tóxico ao sistema, formando quantidade de metaHb semelhante ao controle ($102,5 \pm 0,7\%$).

Nesta série de experimentos, o melhor efeito antioxidante observado foi na concentração de 1 mg/ml para o extrato de couve-manteiga convencional com C/SL e na concentração de 0,1 mg/ml no extrato sem C/SL, sendo este significativamente superior àquele ($n = 3$; $p \leq 0,005$).

Os extratos com e sem C/SL, na concentração de 1 mg/ml, apresentaram ação antioxidante significativamente superior à observada para a vitamina C ($53,2 \pm 0,8\%$) assim como o extrato sem C/SL, na concentração de 0,1 mg/ml ($n = 3$; $p \leq 0,005$).

Quando se investigou os efeitos protetores dos extratos de brócolis obtido de cultivo orgânico sob as mesmas condições experimentais (Figura 19), as concentrações de 0,01 a 10 mg/ml foram capazes de reduzir significativamente sua formação ($n = 3$; $p \leq 0,005$) em comparação à amostra controle, produzindo

63,0 ± 1,2%, 54,5 ± 3,5%, 15,3 ± 1,1% e 26,8 ± 1,7% de metaHb, respectivamente.

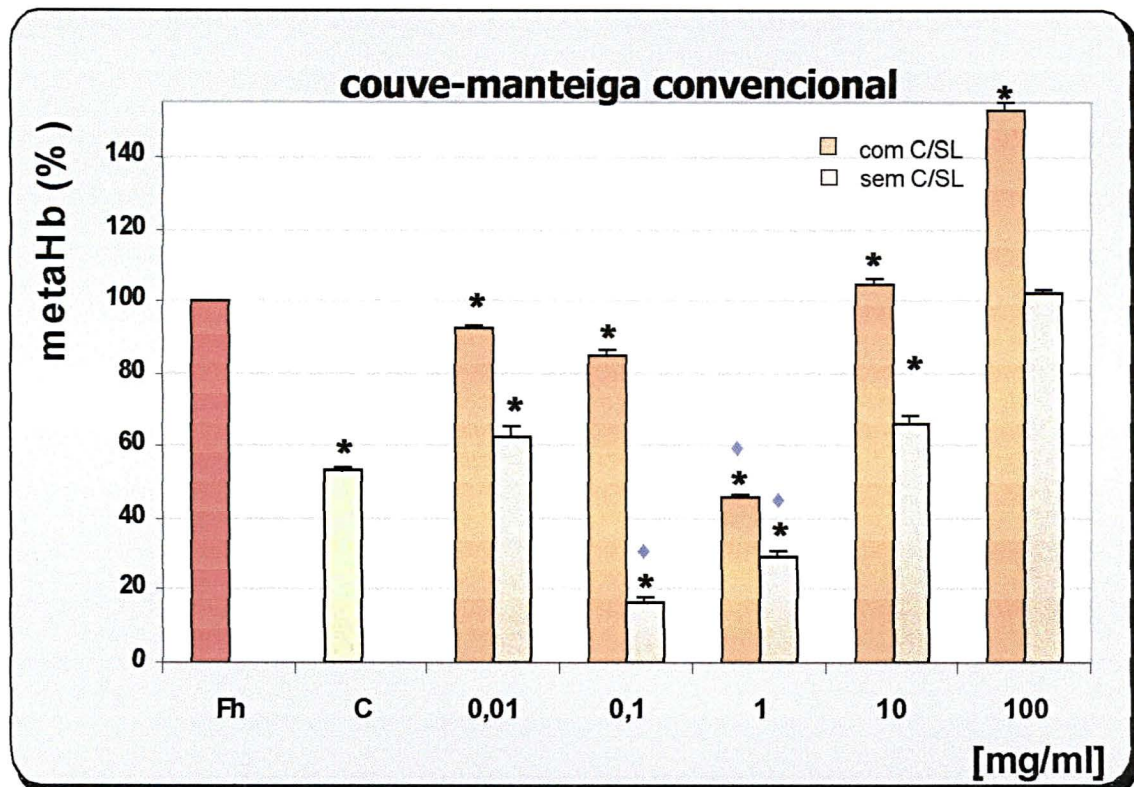


Figura 18. Efeito do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo convencional sobre a formação de metahemoglobina (metaHB) induzida por fenil-hidrazina (Fh) sobre eritrócitos humanos. Suspensão de eritrócitos humanos, pré-tratados ou não com vitamina C (C, 20mM) ou com as concentrações indicadas do extrato de couve-manteiga obtida de cultivo hidropônico, com e sem clorofila e substâncias lipofílicas foram incubadas com Fh (1 mM) por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua e a formação de metaHb obtida pela absorvância em 630 nm, como descrito no item 2.8.4 da seção de Metodologia. Cada coluna representa a média da porcentagem de formação de metaHb ± 1DP, normalizada em 100%, de três experimentos independentes, realizados em triplicata (* $p \leq 0,005$ em relação à Fh; ♦ $p \leq 0,005$ em relação à vitamina C; teste *t* de Student).

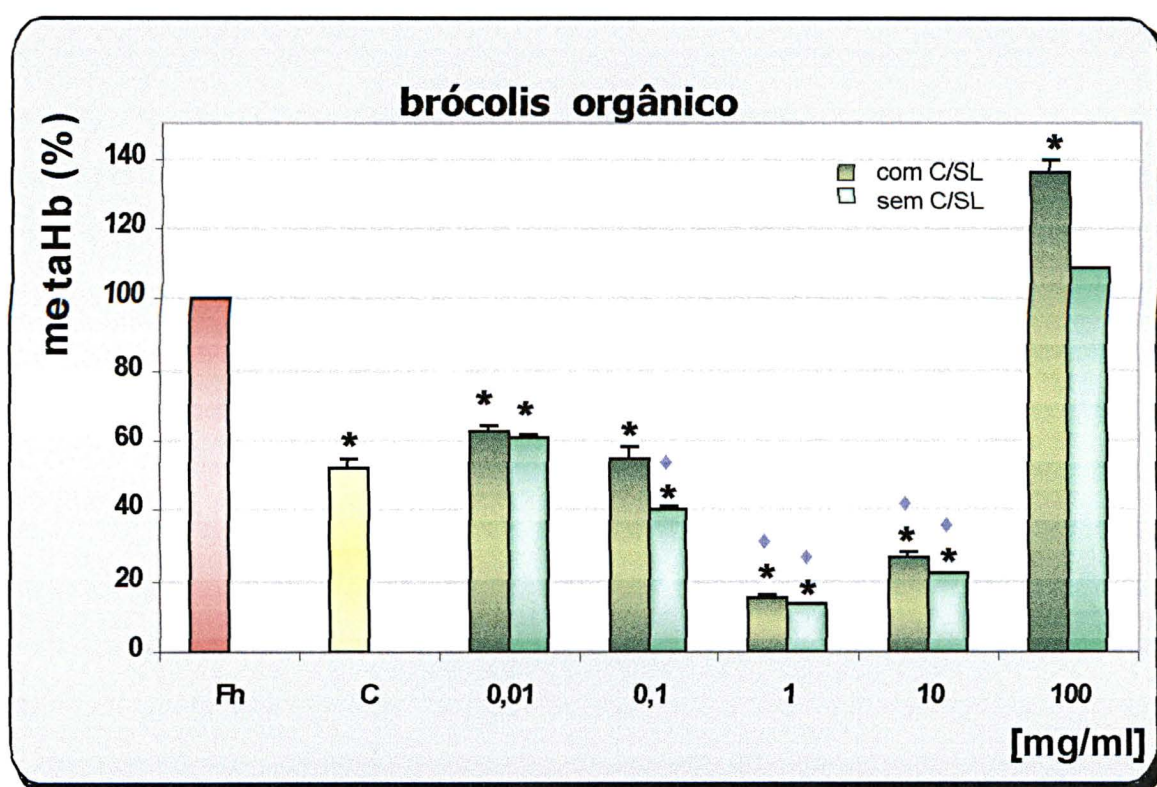


Figura 19. Efeito do extrato de brócolis obtido de cultivo orgânico sobre a formação de metahemoglobina (metaHb) induzida por fenil-hidrazina (Fh) sobre eritrócitos humanos. Suspensão de eritrócitos humanos, pré-tratados ou não com vitamina C (C, 20mM) ou concentrações como indicado do extrato de brócolis obtido de cultivo orgânico, com e sem clorofila e substâncias lipofílicas foram incubadas Fh (1 mM) por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua e a formação de metaHb obtida pela absorvância em 630 nm, como descrito no item 2.8.4 da seção de Metodologia. Cada coluna representa a média da porcentagem de formação de metaHb \pm 1DP, normalizada em 100%, de três experimentos independentes, realizados em triplicata (* $p \leq 0,005$ em relação à Fh; ♦ $p \leq 0,005$ em relação à vitamina C; teste t de Student).

Ao testar-se o extrato de brócolis orgânico onde a clorofila e as substâncias lipofílicas foram extraídas (extrato C/SL), padrão similar de efeito protetor foi observado, com formação de $60,9 \pm 0,5\%$, $40,7 \pm 0,1\%$, $13,6 \pm 0,3\%$ e $22,0 \pm 0,3\%$ de metaHb para as concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 10 mg/ml, respectivamente, todas significativamente inferiores à amostra controle ($n = 3$; $p \leq 0,005$).

Ao investigar-se os extratos com e sem C/SL de brócolis convencional (Figura 20), verificou-se que ambos, na concentração de 0,01 ml/ml, comportaram-se de forma semelhante à vitamina C ($52,4 \pm 2,0\%$), formando $61,6 \pm 1,2\%$ e $67,8 \pm 0,5\%$, respectivamente. No entanto ambos extratos nas concentrações de 1 e 10 mg/ml, mostraram capacidade antioxidante significativamente superior à da vitamina C, com formação de somente $34,6 \pm 1,1\%$, $34,9 \pm 0,3\%$, $33,3 \pm 1,3\%$ e $18,5 \pm 0,4\%$ de metaHb ($n = 3$; $p < 0,005$).

Nesta série de experimentos, o melhor efeito antioxidante observado foi na concentração de 10 mg/ml, independente da presença de clorofila ou substâncias lipofílicas, mas significativamente diferente entre ambos extratos ($p < 0,005$). Além disso e, em contraste com os efeitos protetores observados para as outras concentrações, em ambas frações, os extratos de brócolis, independente do tipo de cultivo, na concentração de 100 mg/ml demonstraram capacidade antioxidante significativamente inferior as demais concentrações, formando mais metaHb do que a própria Fh, com $136,0 \pm 3,7\%$, $109,0 \pm 0,6\%$, $127,2 \pm 3,4\%$ e $131,0 \pm 0,9\%$ para os extratos orgânicos com e sem C/SL e de cultura convencional com e sem C/SL, respectivamente.

Embora se tenha observado um comportamento dependente da dose nos ensaios realizados, em nenhum dos extratos avaliados, o aumento da concentração para 100 mg/ml, resultou em diminuição na formação de metaHb. Ao contrário, observou-se, para a maioria dos extratos analisados, uma diminuição significativa do efeito protetor. É possível que esses resultados sejam decorrentes de um efeito físico indesejável quando extratos concentrados são adicionados à suspensão de eritrócitos devido à perda do estado isosmótico,

passando a um estado hipertônico, desestabilizando o sistema e tornando-o inadequado como modelo experimental.

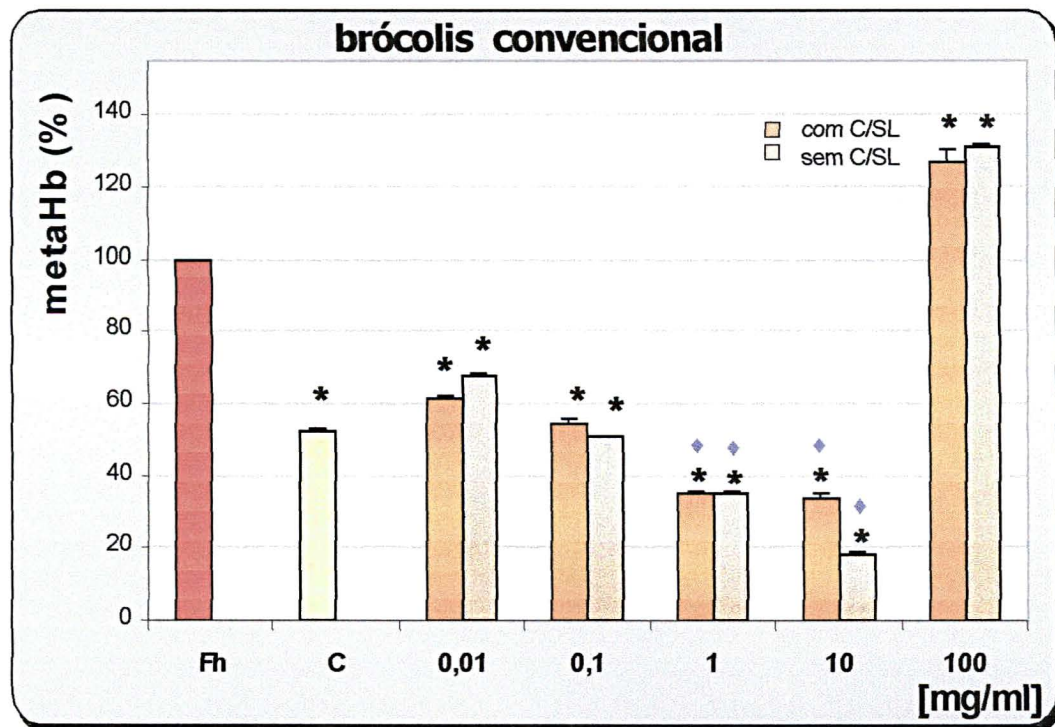


Figura 20. Efeito do extrato de brócolis obtido de cultivo convencional sobre a formação de metahemoglobina (metaHB) induzida por fenil-hidrazina (Fh) sobre eritrócitos humanos. Suspensão de eritrócitos humanos, pré-tratados ou não com vitamina C (C, 20mM) ou concentrações como indicado do extrato de brócolis obtido de cultivo convencional, com ☐ e sem clorofila e substâncias lipofílicas ☐ foram incubadas com Fh (1 mM) por 20 min a temperatura ambiente sob homogeneização contínua e a formação de metaHb obtida pela absorvância em 630 nm, como descrito no item 2.8.4 da seção de Metodologia. Cada coluna representa a média da porcentagem de formação de metaHb \pm 1DP, normalizada em 100%, de três experimentos independentes, realizados em triplicata (* $p \leq 0,005$ em relação à Fh; ♦ $p \leq 0,005$ em relação à vitamina C; teste t de Student).

Conclusões

Os extratos de *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (repolho branco), de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC (couve-manteiga), de *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cauliflora* (couve-flor), de *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa* (brócolis), de *Nasturtium officinalis* Br. (agrião) e de *Raphanus sativus radicular* (rabanete), obtidos de cultivo convencional, hidropônico e orgânico, quando possível, avaliados neste trabalho pelos métodos químicos de redução pelo fosfato de molibdênio e do DPPH e pelo sistema biológico usando o eritrócito humano como modelo, demonstraram, de forma geral, relevante capacidade antioxidante, independente da parte vegetal analisada, corroborando com a literatura concernente ao valor de crucíferas como fonte importante de substâncias antioxidantes (Chu *et al.*, 2002; Farnham, 2003; Hirano *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2002; Nestle, 1998; Ninfali e Bacchiocca, 2003; Ou *et al.*, 2002).

Algumas diferenças no potencial antioxidante desses vegetais, entretanto, foram observadas quando se relaciona as espécies vegetais às diferentes técnicas de cultivo e ao método analítico.

Ao investigar-se a couve-manteiga, o extrato proveniente de cultivo orgânico demonstrou maior capacidade antioxidante, seguida pelo de cultivo hidropônico e convencional. De forma semelhante, o brócolis, quando cultivado organicamente, a capacidade antioxidante demonstrada foi superior àquela do extrato proveniente de cultivo convencional, tanto pelos métodos químicos como para o sistema biológico. Ou seja, o modo de cultivo parece influenciar de forma expressiva a capacidade antioxidante das crucíferas aqui estudadas, sendo o orgânico superior, quando comparado aos cultivos hidropônico e convencional, nos três modelos estudados. Todavia, mesmo com resultados diversos, todos os extratos estudados nas concentrações entre 0,01 e 10 mg/ml, demonstraram um efeito antioxidante dependente da dose e que, na concentração de 10 mg/ml, foram capazes de reduzir em mais de 90% a concentração inicial de DPPH.

Quando a atividade antioxidante dos extratos foi investigada após a retirada da clorofila e das substâncias lipofílicas, tanto no método do DPPH quanto no sistema biológico, avaliados sob condições idênticas aos extratos

originais, observou-se que, independente do tipo de cultivo, todos reduziram maior quantidade de DPPH e, simultaneamente, formaram menor quantidade de metaHb, indicando maior efeito protetor ao sistema. É interessante destacar que a retirada dessas substâncias nos vegetais de cultivo convencional levou a um efeito antioxidante significativamente maior quando comparado ao efeito exercido pelos extratos com C/SL ($p < 0,01$).

Neste contexto, é importante ressaltar que a capacidade antioxidante de misturas complexas, como as dos extratos aqui estudados, não pode ser satisfatoriamente avaliada por um único método e, portanto, diferentes procedimentos devem ser empregados para que a capacidade antioxidante total possa ser medida, levando-se em consideração todas as possíveis variáveis que possam influenciar os resultados.

Embora só o potencial antioxidante de algumas crucíferas tenha sido investigado, os resultados aqui apresentados e discutidos parecem favorecer os efeitos benéficos associados ao seu consumo, com destaque àquelas provenientes de cultivo orgânico. De fato, essas parecem ser as mais saudáveis, não só pelos resultados aqui demonstrados, mas também por não apresentarem resíduos de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos como aqueles observados nos vegetais provenientes de agriculturas convencional e hidropônica, além de um maior teor de nutrientes, como já revisto na introdução deste trabalho.

Como a atividade antioxidante de vegetais, frutas e plantas medicinais tem sido avaliada particularmente por métodos químicos, um dos objetivos deste trabalho foi o de propor um ensaio biológico *in vitro* no qual semelhante atividade pudesse ser investigada de forma sensível, rápida, reprodutível e de custo praticável. Para tanto, optou-se pelo sistema antioxidante natural do eritrócito humano, não apenas pela sua facilidade de obtenção, mas também pela sua relativa estabilidade *in vitro*.

Os resultados preliminares derivados desses ensaios aqui descritos permitiram comparações com os métodos químicos, demonstrando ser factível como um sistema biológico experimental, abrindo um horizonte de possibilidades. Porém, mais estudos são necessários para confirmar sua utilidade como método alternativo para investigar a atividade antioxidante de vegetais e plantas medicinais.

Considerações finais

Desde que as técnicas tradicionais de agricultura foram abandonadas em detrimento do uso massivo de insumos químicos nas plantações, têm-se colhido alimentos menos saudáveis e nutritivos (Adital, 2003). Hoje, sabe-se que o uso de insumos no plantio - como adubos químicos, inseticidas, fungicidas e herbicidas - pode causar problemas à saúde de quem os aplica, ao meio ambiente e à saúde dos consumidores, provavelmente em decorrência de resíduos de agrotóxicos, como anteriormente citado (ANVISA).

Com o volume de descobertas avançando nessa direção, o caminho agora é inverso. Muitos pesquisadores buscam comparar alimentos cultivados convencionalmente com outras técnicas, particularmente a orgânica e a hidropônica, no tocante à qualidade agrônômica (Darolt, 2003; Epagri, 2003), organoléptica, nutricional (Bourn e Prescott, 2002; Williams, 2002) e sanitária (Bourn e Prescott, 2002).

Como as investigações nesta área são, ainda, insipientes, os resultados do presente trabalho, embora simples, vieram trazer contribuições relevantes sobre a influência de diferentes técnicas de cultivo sobre o potencial antioxidante de crucíferas.

Devido à diversidade de vegetais da família Cruciferae presentes na dieta regular dos brasileiros e aos incontáveis efeitos biológicos relacionados com seu consumo, em particular sua atividade antioxidante aqui demonstrada, torna-se relevante a sua ingestão como parte de uma dieta balanceada, tornando-se uma fonte alternativa eficaz de substâncias contra o estresse oxidativo imposto ao organismo humano diariamente.

Referências

- Adital (2003). Agricultura orgânica cresce nos últimos dez anos no Brasil, Disponível em: <http://www.adital.org.br>. **Acesso em 26 de setembro de 2002.**
- Afanas'ev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A. e Potapovitch, A.I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* **38**(11): 1763-1769.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J.D. (1994). *Molecular biology of the cell*. New York.
- Anderson, D. (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* **350**(1): 103-108.
- Anderson, D. e Phillips, B.J. (1999). Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food Chem Toxicol* **37**(9-10): 1015-1025.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. e Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**(1): 183-198.
- ANVISA (2001). ANVISA avalia presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/080601_2.htm. **Acesso em 12 de agosto de 2003.**
- Ascar, J.M. (1985). *Alimentos: aspectos bromatológicos e legais: análise percentual*. São Leopoldo, Unisinos.
- Atamna, H. e Ginsburg, H. (1995). Heme degradation in the presence of glutathione. *J Biol Chem* **270**(42): 24876-24883.
- Azevedo, E. (2003) Qualidade alimentar dos produtos integrais orgânicos. Insular. *Alimentos orgânicos*. 43-62.
- Benavente, G.O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. e Del-Rio, J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolic extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem Toxicol* **68**: 457-462.
- Beutler, E., Dern, R.J. e Alving, A.S. (1995). The hemolytic effect of primaquine. *J Lab Clin Med* **45**: 40-45.
- Bianco, E.M. (2003). Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesapiniaceae. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Curitiba, Universidade Federal do Paraná: 77p.
- Biodinâmico, I. (2003). Planeta Orgânico: tipos de cultivos de alimentos. Disponível em: <http://www.planetaorganico.com.br/>.
- Biology, K.s. (2002). Reactive Oxygen Species. Disponível em: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/ROS.html>. **Acesso em maio de 2003.**
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.

- Boas, B.L., Menezes, P.R., Budel, J.M. e Santos, C.A.M. (2003). *In vitro* antioxidant activity study of five species of carqueja. *Rev Bras Ciências Farmac* **32**(suplemento 2): 228.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. e Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Food Sci Technol* **30**: 609-615.
- Bonnesen, C., Eggleston, I.M. e Hayes, J.D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* **61**(16): 6120-6130.
- Bourn, D. e Prescott, J. (2002). A comparasion of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced food. *Crit. Rev. Food Sci Nutr* **42**(1): 1-34.
- Braca, A., De Tommasi, N., Bari, L.D., Pizza, C., Politi, M. e Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod* **64**: 892-895.
- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I. e Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol* **79**(3): 379-381.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. e Berset, C. (1995). Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* **28**: 25-30.
- Brasil (1999). Instrução Normativa N.007 - Estabelecendo normas para produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Diário Oficial da União. Brasília: 11.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **56**(11): 317-333.
- Burns, J., Gardner, P.T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D.B., Lister, C., Matthews, D., Maclean, M.R., Lean, M.E.J., Duthie, G. e Crozier, A. (2000). Relationship among antioxidant activity vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem* **48**(2): 220-230.
- Cândido, L.M.B. e Campos, A.M. (1995). Alimentos funcionais: uma revisão. *Bol Soc Bras Ciência Tecnol Alim* **29**: 193-203.
- Cao, G., Sofic, E. e Prior, R.L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetable. *J Agric Food Chem* **44**: 3426-3431.
- Carr, A. e Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J* **13**(9): 1007-1024.
- Chakrabarti, S., Sonaye, B., Naik, A. e Nadkarni, B. (1995). Erythrocyte membrane protein damage by oxidation products of phenylhydrazine. *Biochem Mol Biol Internat* **35**(2): 255-263.
- Champe, P. e Harvey, R.A. (1997) Bioquímica Ilustrada. Artes Médicas., São Paulo, 117-123.
- Chang, W.S., Chang, Y.H., Lu, F.J. e Chiang, H.C. (1994). Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res* **14**(2A): 501-506.
- Chang, W.S., Lee, Y.J., Lu, F.J. e Chiang, H.C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* **13**(6A): 2165-2170.
- Chaudiere, J. e Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* **37**(9-10): 949-962.

- Chen, Z.Y. (1996). Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* **79**(2): 157-163.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H. e Kim, S.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* **163**: 1161-1168.
- Chow, C.K. (2002). Antioxidant nutrients and environmental health: introduction. *Toxicol* **180**(1): 1-3.
- Chu, Y.F., Sun, J., Wu, X. e Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* **50**(23): 6910-6916.
- Ciccoli, L., Signorini, C., Alessandrini, C., Ferrali, M. e Comporti, M. (1994). Iron release, lipid peroxidation, and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine. *Exp Mol Pathol* **60**(2): 108-118.
- Claro, L.M. (2002). Ação *in vitro* das vitaminas C e E em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina. Mestrado em Ciências Farmaceuticas. Curitiba, Universidade Federal do Paraná: 99 p.
- Colvin, M.E., Hatch, F.T. e Felton, J.S. (1998). Chemical and biological factors affecting mutagen potency. *Mutat Res* **400**(1-2): 479-492.
- Comar, S.R. (2002). Ação da quercitina, rutina e extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* em eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa, *in vitro*. Departamento de Farmácia. Curitiba, Universidade Federal do Paraná: 99p.
- Conforti, F., Statti, G.A., Tundis, R., Menichini, F. e Houghton, P. (2002). Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia* **73**: 479-483.
- Cotran, R.S., Kumar, V. e Robbins, S.L. (1994) Cellular injury and cellular death. Cotran R.S., Kumar V. e Robbins S.L. *Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders Company. 11-14.
- Dacie, J. e Lewis, S.M. (1995) Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias. Dacie J. e Lewis S.M. *Practical Haematology*. Churchill Livingstone. 210-211.
- Darolt, M.R. (2003). A qualidade dos alimentos orgânicos., Disponível em: <http://www.planetaorganico.com.br/daroltqualid.htm>. Acesso em: 19 de setembro de 2003.
- Dashwood, R.H., Fong, A.T., Arbogast, D.N., Bjeldanes, L.F., Hendricks, J.D. e Bailey, G.S. (1994). Anticarcinogenic activity of indole-3-carbinol acid products: ultrasensitive bioassay by trout embryo microinjection. *Cancer Res* **54**(13): 3617-3619.
- Dekker, M., Verkerk, R. e Jongen, W.M.F. (2000). Predictive modeling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolatos in cabbage. *Trends Food Sci Technol*, **11**: 174-181.
- Delaquis, P. e Mazza, G. (1998) Functional vegetable products. Technomic. *Functional Foods*. 193-201.
- Demirezer, L.O., Kuruuzum-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H.J. e Zeeck, A. (2001). The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source:

- anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochem* **58**(8): 1213-1217.
- Edenharder, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S. e Seeger, K. (1994). In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Food Chem Toxicol* **32**(5): 443-459.
- Ehlers, E. (1996) Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma. Livro da Terra. 178p.
- Emater (2002). Agricultura orgânica/agroecológica. Disponível em: <http://www.emater.br>. **Acesso em 20 de maio de 2003.**
- Epagri (2003). Produção orgânica de batata: produtores reduzem o custo e melhoram a qualidade. Disponível em: http://www.epagri.rct-sc.br/agroecologia/prod_batata.html. **Acesso em 19 de novembro de 2003.**
- Evelyn, K.A. e Malloy, H.T. (1938). Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single sample of blood. *J Biol Chem* **126**: 655-662.
- Fabre, N., Urizzi, P., Souchard, J.P., Frechard, A., Claparols, C., Fouraste, I. e Moulis, C. (2000). An antioxidant sinapic acid ester isolated from *Iberis amara*. *Fitoterapia* **71**(4): 425-428.
- Farnham, M.W. (2003). Vegetable cruciferous - status report. Disponível em: <http://www.arsrin.gov.npqscqsreports/crucifer1201.htm>.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D. e Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* **416**(2): 123-129.
- Ferrali, M., Signorini, C., Ciccoli, L. e Comporti, M. (1992). Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem J* **285** (Pt 1): 295-301.
- Ferreira, J., Ferreira, D.B. e Hanna, H.M. (2003). Agrotóxicos e nossa realidade. Disponível em: <http://www.geocities.com/HotSprings/Spa/7804/arquiv07.htm>. **Acesso em 12 de outubro de 2003.**
- Filho, D.W., Silva, E.L. e Boveris, A. (1999) Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. Yunes R.A. e Calixto J.B. *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Argos. 318-334.
- Fiorani, M., De Sanctis, R., De Bellis, R. e Dacha, M. (2002). Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *Free Rad Biol Med* **32**(1): 64-72.
- Fraga Filho, C. (2003). Radicais Livres: vilões ainda em estudo. *Ciência Hoje* **27**: 60-62.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* **201** (Pt 8): 1203-1209.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. e Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* **48**(10): 4581-4589.

- Guo, J., Lee, H., Chiang, S., Lin, F. e Chang, C. (2001). Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *J Food Drug Anal* **9**(2): 96-101.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad Res* **31**: 261-272.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. e Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **16**(6): 845-850.
- Hatherill, J.R., Till, G.O. e Ward, P.A. (1991). Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Agents Actions* **32**(3-4): 351-358.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* **32**(7): 1141-1148.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* **96**(2-3): 67-202.
- Heijnen, C.G., Haenen, G.R., van Acker, F.A., van der Vijgh, W.J. e Bast, A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* **15**(1): 3-6.
- heinz (1890). *Almeriane*.
- Herrmann, K. (1994). Allgemeine chemische zusammensetzung einschließlic der mireralstoffe, spurenelemente und vitamine. *Die industrielle obst und gemüseverwertuz* **7**: 244-252.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B. e Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**(8878): 1007-1011.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. e Katan, M.B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetable and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* **40** : 1112-1117.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O. e Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **47**(5): 357-362.
- Hogg, J.S., Lohmann, D.H. e Russell, K.E. (1961). The kinetics of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with phenols. *Canadian J Chem* **39**: 1588-1594.
- Holley, A.E. e Cheeseman, K.H. (1993). Measuring free radical reactions in vivo. *Br Med Bull* **49**(3): 494-505.
- Hu, Y., Xu, J. e Hu, Q. (2003). Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) extracts. *J Agric Food Chem* **51**(26): 7788-7791.
- Jay, V. e Berthon, J.Y. (1998). New active ingredient for aging prevention. *Cosmetics and Toiletries magazine* **113**: 71-77.
- Justesen, U., Knuthsen, P. e Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavonones in fruits, vegetable and beverages by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and mass spectrometric detection. *J Chromatog* **799**: 101-110.
- Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y. e Lee, C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* **51**(22): 6509-6515.

- Kim, Y.K., Guo, Q. e Packer, L. (2002). Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicol* **172**(2): 149-156.
- Koleva, Il, van Beek, T.A., Linssen, J.P., de Groot, A. e Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* **13**(1): 8-17.
- Kontogiorgis, C. e Hadjipavlou-Litina, D. (2003). Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. *J Enz Inhib Med Chem* **18**(1): 63-69.
- Krul, C., Luiten-Schuite, A., Baandaggar, R., Verhagen, H., Mohn, G., Feron, V. e Havenaar, R. (2000). Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food Chem Toxicol* **38**(9): 783-792.
- Kuo, J.M., Yeh, D.B. e Pan, B.S. (1999). Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J Agric Food Chem* **47**(8): 3206-3209.
- Kurilich, A.C., Jeffery, E.H., Juvik, J.A., Wallig, M.A. e Klein, B.P. (2002). Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *J Agric Food Chem* **50**(18): 5053-5057.
- Kurilich, A.C., Tsau, G.J., Brown, A., Howard, L., Klein, B.P., Jeffery, E.H., Kushad, M., Wallig, M.A. e Juvik, J.A. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of *Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem* **47**(4): 1576-1581.
- Leake, D.S. (2001). Flavonoids and the oxidation of low-density lipoprotein. *Nutrition* **17**(1): 63-66.
- Leitão, R.N. (2003). A química na alimentação. Disponível em: <http://ruinuno.50megs.com/quimica.html>. Acesso em 10 de agosto de 2003.
- Leonard, S.S., Cutler, D., Ding, M., Vallyathan, V., Castranova, V. e Shi, X. (2002). Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid. *Ann Clin Lab Sci* **32**(2): 193-200.
- Lin, C.C., Hsu, Y.F. e Lin, T.C. (2001). Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins of *Terminalia catappa* L. *Anticancer Res* **21**(1A): 237-243.
- Llorach, R., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. e Ferreres, F. (2003). Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) by-products as a source of antioxidant phenolics. *J Agric Food Chem* **51**(8): 2181-2187.
- Lon, S., Szczepanska-Sadowska, E., Paczwa, P. e Ganten, D. (1999). Enhanced blood pressure buffering role of the brain nitrenergic system in renin transgenic rats. *Brain Res* **842**(2): 384-391.
- Lu, Y. e Food, L.Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem* **75**: 197-202.
- Magnani, L., Gaydou, E.M. e Hubaud, J.C. (2000). Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Anal Chim Acta* **41**: 209-216.

- Malec (1984). Hydroxyurea has the capacity to induce damage to human erythrocytes which can be modified by radical scavengers. *J Agric Food Chem* **100**: 125-158.
- Mansour, E.H. e Khalil, A.H. (2000). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. *Food Chem* **69**: 135-141.
- Mansouri, A. (1985). Methemoglobinemia. *Am J Med Sci* **289**(5): 200-209.
- Mansouri, A. e Lurie, A.A. (1993). Concise review: methemoglobinemia. *Am J Hematol* **42**(1): 7-12.
- Matthaus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J Agric Food Chem* **50**(12): 3444-3452.
- May, J.M. (1998). Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. *Front Biosci* **3**: D1-D10.
- May, J.M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb J* **13**(9): 995-1006.
- McGowan, J.C., Powell, T. e Raw, R. (1959). The rates of α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl with certain amines and phenols. *J Chem Soc*: 3103-3110.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S. e Leitao, S.G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* **15**(2): 127-130.
- Misra, H.P. e Fridovich, I. (1976). The oxidation of phenylhydrazine: superoxide and mechanism. *Biochem* **15**(3): 681-687.
- Miyazawa, M., Khatounian, C.A. e Odenath, P.L.A. (2001). Teor de nitrato nas folhas de alface produzidas em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. *Agroecologia Hoje* **7**: 23.
- Naoum, P.C. (1997) Eritrócitos: metabolismo e estresse oxidativo. Naoum P.C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo, Sarvier. 11-15.
- Nestle, M. (1998). Broccoli sprouts in cancer prevention. *Nutr Rev* **56**(4 Pt 1): 127-130.
- Nielsen, S.E., Kall, M., Justesen, U., Schou, A. e Dragsted, L.O. (1997). Human absorption and excretion of flavonoids after broccoli consumption. *Cancer Lett* **114**(1-2): 173-174.
- Ninfali, P. e Bacchiocca, M. (2003). Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *J Agric Food Chem* **51**(8): 2222-2226.
- Oliveira, C.P.M.S. (2003). Radicais livres e estresse oxidativo. Disponível em: http://www.fugesp.org.br/Revistas/nutricao/Nutric_04/nutric4_indice.htm. **2003**.
- Ormond, J.G.P., Paula, S.R.L., Filho, P.F. e Rocha, L.T.M. (2002). Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. BNDES Setorial: 3-34.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. e Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem* **50**(11): 3122-3128.

- Peisach, J., Blumberg, W.E. e Rachmilewitz, E.A. (1975). The demonstration of ferrihemochrome intermediates in heinz body formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine. *Biochim Biophys Acta* **393**(2): 404-418.
- Penteado, S.R. (2000) Introdução a agricultura orgânica. Campinas, Ed. Grafimagem. 110.
- Perrin, D.D., Aemarego, W.L.F. e Perrin, D.R. (1966). *Purification of Laboratory chemicals*. Oxford, Pergamon Press.
- Plumb, G.W., Price, K.R., Rhodes, M.J. e Williamson, G. (1997). Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radic Res* **27**(4): 429-435.
- Podda, M. e Grundmann-Kollmann, M. (2001). Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol* **26**(7): 578-582.
- Pokorny, J. (1987) Major factors affecting the autoxidation in lipids. Chan H. *Autoxidation of unsaturated lipids*. London, Academic Press. 141-206.
- Prieto, P., Pineda, M. e Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* **269**(2): 337-341.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. e Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidant to human health. *Tren Food Sci Technol*, **6**(3): 75-82.
- Rao, A.V. e Agarwal, S.v., p. 305 - 323, 1999. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr Res*, **19**: 305-323.
- Ren, H., Endo, H. e Hayashi, T. (2001). Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated green vegetable using water-soluble chitosan as a soil modifier ad leaf surface spray. *J Sci Food Agric*. **81**: 1426-1432.
- Renz, S.V. (2003). Oxidação e antioxidantes. Disponível em: http://www5.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/oxid_antiox.pdf. **Acesso em 12 de setembro de 2003.**
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. e Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **20**(7): 933-956.
- Rodet, J.C. (2003). Os nitratos, o meio ambiente e a saúde. Disponível em: <http://www.taps.org.br/alim02.htm>. **Acesso em 15 de agosto de 2003.**
- Saltman, P. (1989). Oxidative stress: a radical view. *Semin Hematol* **26**(4): 249-256.
- Sandoval, M., Okuhama, N.N., Angeles, F.M., Melchor, V.V., Condezo, L.A., Lao, J. e Miller, M.J.S. (2002). Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lipidium meyenii*). *Food Chem* **79**: 207-213.
- Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T. e Yoshino, K. (2003). Determination of peroxy radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator. *J Agric Food Chem* **51**(10): 2912-2916.

- Santos, K.C. (2003). Atividade sedativa e ansiolítica dos extratos de *Passiflora actinia* Hooker, PASSIFLORACEA. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Curitiba, UFPR: 77.
- Singh, G., Kawatra, A. e Sehgal, S. (2001). Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. *Plant Foods Hum Nutr* **56**(4): 359-364.
- Smith, B. (1993). Organic foods vs. supermarked foods: element levels. *Journal of Appl Nutr*. **45**: 35-39.
- Sorensen, M., Jensen, B.R., Poulsen, H.E., Deng, X., Tygstrup, N., Dalhoff, K. e Loft, S. (2001). Effects of a Brussels sprouts extract on oxidative DNA damage and metabolising enzymes in rat liver. *Food Chem Toxicol* **39**(6): 533-540.
- Sousselier, L. e Berthon, J.Y. (1998). Phytobioactives and their role in preventing skin aging. *Happi* **10**: 93-96.
- Spilkova, J. e Dusek, J. (1996). [Natural substances with antioxidant activity]. *Ceska Slov Farm* **45**(6): 296-301.
- Steinkellner, H., Rabot, S., Freywald, C., Nobis, E., Scharf, G., Chabicovsky, M., Knasmüller, S. e Kassie, F. (2001). Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res* **480-481**: 285-297.
- Steinmetz, K.A. e Potter, J.D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* **96**(10): 1027-1039.
- Stern, A. (1989). Drug-Induced oxidative denaturation in red blood cells. *Sem Hematol* **26**(4): 301-306.
- Suisse, C.F. (1995). *Pharmacopoea Helvetica*. Switzerland, Berne: Departament Fédéral de l'Intérieur. 1 1 1990.
- Tang, Y., Lou, F., Wang, J., Li, Y. e Zhuang, S. (2001). Coumaroyl flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba*. *Phytochem* **58**(8): 1251-1256.
- Telen, M.J. e Kaufman, R.E. (1999) The mature erythrocyte. Lee G.R., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J.P. e Rodgers G.M. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. vol. 1. 193-228.
- Toit, R., Volsteadt, Y. e Apostolides, Z. (2001). Comparasion of the antioxidant content of fruit, vegetable and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicol* **166**: 63-69.
- Van Acker, S.A., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., Bast, A. e van der Vijgh, W.J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **56**(8): 935-943.
- VanDuijn, M.M., Van der Zee, J. e Van den Broek, P.J. (2001). The ascorbate-driven reduction of extracellular ascorbate free radical by the erythrocyte is an electrogenic process. *FEBS Lett* **491**(1-2): 67-70.
- VanDuijn, M.M., Van der Zee, J. e Van den Broek, P.J. (2002). Analysis of transmembrane redox reactions: interaction of intra- and extracellular ascorbate species. *Methods Enzymol* **352**: 268-279.
- Vang, O., Mortensen, J. e Andersen, O. (2001). Biochemical effects of dietary intake of different broccoli samples. II. Multivariate analysis of contributions of specific glucosinolates in modulating cytochrome P-450 and antioxidant defense enzyme activities. *Metabolism* **50**(10): 1130-1135.

- Verhoeven, D.T., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A. e van Poppel, G. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* **103**(2): 79-129.
- Wagner, H. e Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis a thin layer chromatography*. Germany, Springer, 384p.
- WCRF (2002). Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Disponível em: <http://www.aicr.org>.
- Wickens, A.P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol* **128**(3): 379-391.
- Willett, W.C. (1994). Diet and health: what should we eat? *Science* **264**(5158): 532-537.
- Williams, C.M. (2002). Nutritional quality of organic food: shades of grey or shades of green? *Proc Nutr Soc* **61**: 19-24.
- Yamamoto, Y. (2001). Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J Dermatol Sci* **27 Suppl 1**: S1-4.
- Zhu, C.Y. e Loft, S. (2001). Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* **39**(12): 1191-1197.

Anexos

Anexo A

Curitiba, 01 de outubro de 2003.

Ilmo (a) Sr. (a)

Dra. Kettelin Aparecida Arbos

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**ESTUDO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE CRUCÍFERAS**", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 30 de setembro de 2003, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Protocolo CEP/HC 100EXT054/2003-09

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 01 de abril de 2004.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

Anexo B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) O objetivo deste projeto de pesquisa é estabelecer e padronizar um ensaio biológico *in vitro*, que possa, de forma dinâmica, demonstrar a atividade antioxidante de constituintes de vegetais crucíferos como brócolis, couve-flor, couve-manteiga, rabanete e repolho, tradicionalmente utilizadas pela população como parte da dieta usual.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário doar uma amostra de sangue a qual será obtida por punção venosa de uma de suas veias, localizadas na região da prega do cotovelo. A quantidade de sangue por você doada será destinada à separação dos eritrócitos para padronização do método de formação de metahemoglobina.
- c) Como em qualquer outro diagnóstico clínico-laboratorial, você poderá experimentar alguns leves desconfortos relacionados a essa coleta, porém de ordem passageira.
- d) Estão garantidas todas as informações pertinentes ao projeto que você queira obter, antes, durante e depois do estudo.
- e) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar do estudo ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- f) As informações relacionadas a este estudo poderão ser inspecionadas por profissionais que executam a pesquisa ou por autoridades legais. No entanto, no caso de alguma informação ser divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.
- g) Em caso de necessidade, você poderá comunicar-se imediatamente com Kettelin Aparecida Arbos ou Almeriane Maria Weffort Santos, nos telefones 3022 2970, 360 4087 ou 232 4037.
- h) Todas as despesas necessárias para a realização dessa pesquisa (exames, etc) não são da responsabilidade do doador.
- i) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome e, sim, um código.

Eu, _____, abaixo assinado, li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo desse estudo do qual fui convidado a participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do doador

____/____/____
Data

Assinatura do Pesquisador

____/____/____
Data